



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO



INSTITUTO DE CIÊNCIAS AMBIENTAIS, QUÍMICAS E FARMACÊUTICAS

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ANÁLISE AMBIENTAL INTEGRADA

THALES DE SOUZA BATTISTIN

Eletroforese Capilar para monitoramento ambiental: Avaliação das estratégias de pré-concentração *on-line* e *off-line* para analisar contaminantes emergentes em efluentes

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria de Lourdes Leite de Moraes
Co-orientador: Prof. Dr. Leandro Augusto Calixto

Diadema
2019

THALES DE SOUZA BATTISTIN

Eletroforese Capilar para monitoramento ambiental: Avaliação das estratégias de pré-concentração *on-line* e *off-line* para analisar contaminantes emergentes em efluentes

Dissertação apresentada, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências do ao Programa de Pós - Graduação *Strictu Sensu* do Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas da Universidade Federal de São Paulo – Campus Diadema.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria de Lourdes Leite de Moraes
Co-orientador: Prof. Dr. Leandro Augusto Calixto

Diadema
2019

Battistin, Thales de Souza

Eletroforese Capilar para monitoramento ambiental: Avaliação das estratégias de pré-concentração *on-line* e *off-line* para analisar contaminantes emergentes em efluentes / Thales de Souza Battistin. – Diadema, 2019.

52 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós-Graduação em Análise Ambiental Integrada) - Universidade Federal de São Paulo - Campus Diadema, 2019.

Orientador: Maria de Lourdes Leite de Moraes

Co-Orientador: Leandro Augusto Calixto

1. DEET 2. Permetrina 3. 17α -etinilestradiol 4. Cafeína
5. Monitoramento I. Título.

CDD 628.52

*Dedico este trabalho aos meus pais pelo exemplo
de coragem, simplicidade e perseverança em suas
metas.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus que iluminou o meu caminho durante esta caminhada.

À Professor Dr^a. Maria de Lourdes Leite Moraes, pela oportunidade, paciência e por todos os ensinamentos. Pela excelente orientação e confiança depositada em mim.

Ao Professor Dr. Leandro Augusto por toda a atenção e compartilhamento do conhecimento em diversas áreas, contribuindo para minha formação acadêmica.

À minha mãe, Francisca Aparecida de Souza Battistin, pelo amor e incentivo incondicional em todas as etapas da minha vida. Eu não chegaria até este estágio da minha vida se não fosse por ela.

Ao meu falecido pai, Adilson João Battistin, pelo amor e por ser o meu maior exemplo. Eu não chegaria até este estágio da minha vida se não fosse por ele.

Ao Professor Dr. Daniel Rettori, pela atenção e por todos os ensinamentos durante a minha graduação. Compartilhando o seu conhecimento em diversas áreas, contribuindo para minha formação acadêmica e social.

Ao Centro de Equipamentos e Serviços Multiusuários (NIPE) e a secretária de pós-graduação pela ajuda com eficiência e disposição.

Aos membros do Lab In Science pelos momentos de debate, reflexão e apoio.

A todos os professores do programa de pós-graduação de Análise Ambiental Integrada da Universidade Federal de São Paulo, campus Diadema, por terem me proporcionado desenvolvimento e crescimento intelectual durante o mestrado;

A todos os meus professores do Colégio Villa-Lobos, Escola Fundamental (Londrina-PR) e Colégio Singular SBC por todos os ensinamentos, paciência e dedicação.

Aos meus alunos que todos os dias me ensinam a ser um professor e uma pessoa melhor.

À Mariana de Oliveira dos Santos, pelo amor, carinho, paciência, companheirismo, incentivo e dedicação sempre.

À Elaine Zoppei dos Santos e Rosemeire de Souza Fôlego pelo carinho, apoio e confiança em diversas etapas da minha vida.

Aos meus tios, João Eduardo de Souza, Joaquim de Souza, Iladir de Souza Mendes e Ilzidinha Mendes de Souza por toda ajuda e carinho fornecidos para que eu sempre conseguisse atingir meus objetivos.

Aos meus falecidos avós, Lauro Antonio de Souza, Luiz Battistin, Joana Mendes de Souza e Teresa Battistin, por todo amor e ensinamentos que deram durante suas vidas.

Resumo

Contaminantes emergentes são substâncias químicas de ocorrência natural ou antrópica que não tem controle no ambiente e têm condições latentes de ecotoxicidade e efeitos deletérios sobre a saúde humana. Produtos de higiene pessoal, repelentes, medicamentos, inseticidas, entre outros, que chegam aos corpos hídricos de maneira frequente, fazem parte destes contaminantes. O N,N-Dietil-m-toluidina (DEET) e o 3-fenoxibenzil(1RS)-*cis,trans*-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato (permetrina), utilizados como repelente contra insetos e no tratamento da infestação por piolhos, respectivamente, têm sido encontrados em ambientes aquáticos. Ao lado destes, os estrógenos também têm despertado a atenção das agências ambientais, em especial o 17- α -etinilestradiol, que é um hormônio sintético empregado em pílulas anticoncepcionais e considerado um desregulador endócrino. Devido à baixa concentração destes compostos encontrada em água, sua análise tem sido conduzida por técnicas cromatográficas, empregando a detecção por espectrometria de massas, o que gera análises com alto custo e mão de obra especializada. O desenvolvimento de métodos de análise com baixo custo, que propicie a determinação de diferentes classes de contaminantes simultaneamente, com limites de quantificação aceitável, devem ser investigados. Adicionalmente vale destacar que efluentes apresentam alta atividade estrogênica, sendo observada a presença de elevadas concentrações de cafeína, tornando este composto um importante marcador da presença de contaminantes emergentes. Neste sentido, este trabalho teve por finalidade avaliar métodos de pré-concentração on-line e off-line para análise concomitante de DEET, permetrina, 17- α -etinilestradiol e cafeína, empregando como técnicas de análise a eletroforese capilar (CE) e a cromatografia líquida (HPLC) empregando os detectores ultravioleta e de fluorescência. As condições otimizadas para o HPLC foram: coluna C₁₈, fase móvel ACN/H₂O com um gradiente na proporção 45:55 (v/v) até 8 min, seguida de 95:5 (v/v) até 18 min, vazão de 1 mL min⁻¹ e temperatura de 25 \pm 2°C em 220 nm por UV e λ_{ex} = 280 nm e λ_{em} = 310 nm por fluorescência. Para a CE, a separação para a cafeína, DEET e permetrina, foi obtida empregando o modo de cromatografia eletrocínética micelar (MEKC). A separação foi conduzida em tampão contendo 30 mmol L⁻¹ tetraborato de sódio e 40 mmol L⁻¹ de SDS, pH 9,2; injeção hidrodinâmica (0,5 psi por 5s); temperatura de 25°C e 15 kV de tensão. Ambos os métodos em HPLC e em CE foram eficientes, separando os compostos e ainda os dois isômeros da permetrina em menos de 20 min. Como estratégia de pré-concentração off-line foi avaliada a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) empregando como solvente extrator clorofórmio e como dispersor acetonitrila. A recuperação foi de aproximadamente de 37% para a cafeína, 36% para o DEET, 32% para o 17 α -etinilestradiol, 81% para a *cis*-permetrina e 97% para a *trans*-permetrina. Para a pré-concentração on-line em CE foram avaliadas três estratégias: o *stacking* em modo normal, o *stacking* em campo amplificado, *stacking* mediado por sal e o *sweeping*. As estratégias on-line foram satisfatórias, sendo simples de serem realizadas e proporcionaram aumentos da ordem de 5-7 vezes para os compostos.

Palavras-chave: DEET, Permetrina, 17 α -etinilestradiol, Cafeína e Monitoramento.

ABSTRACT

Emerging contaminants are naturally occurring or anthropogenic chemicals that have no control over the environment and have latent ecotoxicity conditions and deleterious effects on human health. Personal products, repellents, medicines, insecticides, among others, that frequently reach the water bodies, are part of these contaminants. N, N-Diethyl-m-toluamide (DEET) and 3-phenoxybenzyl (1RS)-cis, trans-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate (permethrin), used as insect repellent and in the treatment of lice infestation, respectively, have been found in aquatic environments. Alongside these, estrogens have also attracted the attention of environmental agencies, especially 17- α ethinyl estradiol, which is a synthetic hormone used as oral contraceptive pills and considered an endocrine disruptor. Due to the low concentration of these compounds found in water, their analysis has been conducted by chromatographic techniques with mass spectrometric detection, which generates high cost and specialized analyst. The development of low cost methods that allow the determination of different classes of contaminants simultaneously with acceptable limits of quantification should be investigated. Additionally, it is worth mentioning that effluents present high estrogenic activity, being observed the presence of high caffeine concentrations, making this compound an important marker of the presence of emerging contaminants. In this sense, this study aimed to evaluate online and offline preconcentration methods for concomitant analysis of DEET, permethrin, 17- α -ethinylestradiol and caffeine, using capillary electrophoresis (CE) and liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet and fluorescence detectors. The optimized conditions for HPLC were: column C₁₈, mobile phase ACN / H₂O with a 45:55 (v / v) gradient to 8 min, followed by 95: 5 (v / v) up to 18 min, flow rate of 1 mL/min and temperature 25 \pm 2 $^{\circ}$ C, detection by UV at 220 nm and by fluorescence λ_{ex} = 280 nm and λ_{em} = 310 nm. Micellar electrokinetic chromatography (MEKC) mode was used for the separation of caffeine, DEET and permethrin. Separation was conducted in buffer containing 30 mmol L⁻¹ sodium tetraborate and 40 mmol L⁻¹ SDS, pH 9.2; hydrodynamic injection (0.5 psi for 5s); temperature of 25 $^{\circ}$ C and 15 kV voltage. Both HPLC and CE methods were efficient, separating the compounds and the two permethrin isomers in less than 20 min. Dispersive liquid microextraction (DLLME) was evaluated as off-line preconcentration strategy using chloroform as extractor solvent and acetonitrile as disperser solvent. Recovery was approximately 37% for caffeine, 36% for DEET, 32% for 17 α -ethinyl estradiol, 81% for cis-permethrin and 97% for trans-permethrin. Stacking strategies were evaluated as online CE pre-concentration: normal mode stacking, amplified field stacking, salt-mediated stacking and sweeping. Stacking strategies were satisfactory, simple to perform and provided 5-7 fold increases for the compounds.

Keywords: DEET, Permethrin, 17 α -ethinylestradiol, caffeine, monitoring.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. DEET (N,N dietil-3-metilbenzamida).....	12
Figura 2. Isômeros da permetrina.....	14
Figura 3. Estrutura molecular do 17 α -etinilestradiol (a) e do 17 β -estradiol (b).....	16
Figura 4. Cafeína.....	18
Figura 5. Esquema da técnica de eletroforese capilar.....	20
Figura 6. Esquema representativo da separação por MEKC usando micelas aniônicas	21
Figura 7. Modelo de <i>stacking</i> em modo normal (SMN).....	22
Figura 8. Modelo de <i>stacking</i> em modo de campo amplificado (SMCA).....	23
Figura 9. Modelo de <i>stacking</i> mediado por adição de sal (SMAS).....	24
Figura 10. Modelo de <i>sweeping</i> na presença de EOF.....	25
Figura 11. Esquema DLLME.....	26
Figura 12. Separação da mistura de 17 α -etinilestradiol, DEET e permetrina.....	32
Figura 13. Separação da mistura de 17 α -etinilestradiol, DEET, permetrina e cafeína.....	33
Figura 14. Curva de calibração mostrando a linearidade do método no intervalo de 0,25 a 10 mg L ⁻¹	34
Figura 15. Amostra fortificada com DLLME.....	35
Figura 16. Mix das soluções de cafeína (1), DEET (2), 17 α -etinilestradiol (3), permetrina (4), após a DLLME.....	36
Figura 17. Eletroferograma da mistura da solução padrão dos compostos a 10 mg L ⁻¹ em diferentes tampões.....	38
Figura 18. Eletroferograma da mistura da solução padrão dos compostos a 10 mg L ⁻¹	39
Figura 19. Verificação da co-eluição da permetrina e do 17 α -etinilestradiol.....	39
Figura 20. Estratégias de pré-concentração on-line aplicadas aos padrões dos compostos....	41
Figura 21. Tentativa de <i>sweeping</i> da amostra preparada em borato.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de recuperação a partir da área após a DLLME.....	32
Tabela 2. Figuras de mérito instrumental para os padrões de Cafeína, DEET, isômeros da permetrina (UV/DAD) e 17 α -etinilestradiol (FLD).....	34
Tabela 3. Fatores de enriquecimento do DEET, 17 α -etinilestradiol e dos isômeros da permetrina.....	36
Tabela 4. Propriedades dos analitos.....	37
Tabela 5. Comparação das áreas dos picos dos padrões com e sem a aplicação da estratégia de pré-concentração on-line.....	42
Tabela 6. Comparação dos aumentos das áreas dos eletroferogramas da figura 20.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACN - Acetonitrila
APCI - Ionização química à pressão atmosférica.
GC-MS – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CE – Eletroforese Capilar
CMC - Concentração micelar crítica
CV – Coeficiente de variação
DAD - detector de arranjo de diodos
DEET - N,N dietil-3-metilbenzamida
DLLME - Microextração líquido-líquido dispersiva
EOF – Fluxo eletrosmótico
EPA - *United States Environmental Protection Agency*
ESI – Ionização por electrospray
FLD - Detecção por fluorescência
HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência
LC-MS / MS - Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas
LC-ESI-MS /MS - Cromatografia líquida acoplado à um espectrômetro massa com uma fonte de ionização por electropulverização
LD – Limite de detecção
LLOQ - Limite inferior de quantificação
LMR - Limite máximo de resíduo
log D – Coeficiente de distribuição.
log P – Coeficiente de partição octanol-água.
LQ – Limite de quantificação
MEKC - Cromatografia eletrocinética micelar
MEOH – Metanol
pka – Constante de dissociação ácida
SPE- Extração em fase sólida.
SMN - *Stacking* em modo normal
SMCA - *Stacking* em modo de campo amplificado
SMAS - *Stacking* mediado por adição de sal
SDS - Dodecil sulfato de sódio
USGS - *United States Geological Survey*
UA- SPNE - Nanoextração em fase sólida assistida por ultrassom

Sumário

1 – Introdução	11
1.1 Contaminantes emergentes	11
1.2 DEET	11
1.3 Permetrina	13
1.4 Hormônios	15
1.5 Cafeína	17
1.6 Legislação	18
1.7 Eletroforese Capilar	19
1.8 Estratégias de pré-concentração “on-line”	21
1.8.1 <i>Stacking</i> em modo normal (SMN)	22
1.8.2 <i>Stacking</i> em modo de campo amplificado (SMCA)	23
1.8.3 <i>Stacking</i> mediado por adição de sal (SMAS)	23
1.8.4 <i>Sweeping</i>	24
1.9 - Estratégias de pré-concentração “off-line”	25
1.9.1 - Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)	25
1.10 – Justificativa	27
2. Objetivo Geral	27
2.1 Objetivos específicos	28
3. Parte Experimental	28
3.1 Material	28
3.2 Métodos	28
3.2.1 Cromatografia em fase líquida de alta eficiência (HPLC)	28
3.2.2 Pré-concentração “of-line” (DLLME)	29
3.2.3 Recuperação, limite de detecção e quantificação e fator de enriquecimento	29
3.2.4 Eletroforese Capilar (CE)	30
3.2.5 Pré-concentração “on-line” (<i>stacking</i> e <i>sweeping</i>)	31
4. Resultados e Discussão	31
4.1 Cromatografia em fase líquida de alta eficiência (HPLC)	31
4.1.1 Determinação simultânea da permetrina, DEET e 17 α - etinilestradiol utilizando DLLME-HPLC-DAD-FLD	31
4.1.2 Determinação simultânea de cafeína, permetrina, DEET e 17 α - etinilestradiol utilizando HPLC-DAD-FLD	33
4.2 Cromatografia eletrocinetica Micelar (MEKC)	40
4.2.1 Estratégias de pré-concentração “on line”	40
5. Conclusão	44
6. Referências	45

1. Introdução

1.1 Contaminantes Emergentes

Contaminante pode ser definido como qualquer substância que se encontra em um local ao qual não pertence, causando risco à saúde de humanos e ao ambiente. Já para contaminantes emergentes diversas definições são encontradas. O *United States Geological Survey* (USGS) definiu contaminante emergente como qualquer produto químico, sintético ou natural, ou qualquer microrganismo que não é comumente monitorado no ambiente, mas tem o potencial de entrar no ambiente e causar efeitos adversos (conhecidos ou suspeitos) ecológicos e (ou) sobre a saúde de humanos. Já a *United States Environmental Protection Agency* (EPA) definiu contaminante emergente como produto químico ou material caracterizado por uma ameaça percebida, potencial ou real para a saúde humana ou meio ambiente. Segundo Sauvé e Desrosiers, os contaminantes emergentes podem ser produtos químicos ou materiais que já foram descobertos ou suspeitos de estarem presentes no meio ambiente e cuja toxicidade ou persistência são suscetíveis de afetar o metabolismo de um ser vivo ou meio ambiente (SAUVÉ; DESROSIERS, 2014).

Independente da definição, a liberação destes contaminantes para o meio ambiente provavelmente ocorreu por um longo tempo, não tendo sido avaliados devido à ausência de métodos de detecção mais sensíveis, uma vez que os níveis de concentrações destes contaminantes no meio ambiente podem estar na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$ ou ng L^{-1} (SAUVÉ; DESROSIERS, 2014).

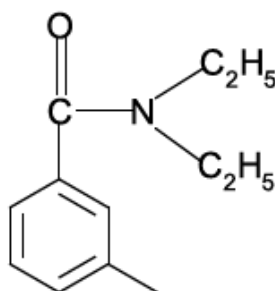
Os contaminantes emergentes incluem desde produtos farmacêuticos a produtos de higiene pessoal, herbicidas, plastificantes, entre outros. O alto consumo de produtos farmacêuticos e de higiene pessoal que são, após o uso, descartados diariamente no esgoto doméstico, sendo uma fonte de contaminantes emergentes no ambiente, chegando até mesmo às águas superficiais, pode ser classificado com um problema socioambiental, visto que na atualidade o consumo direciona as relações entre as pessoas e o meio ambiente (SAUVÉ; DESROSIERS, 2014; JARDIM, 2013).

1.2 DEET

O DEET (N,N dietil-3-metilbenzamida) (Figura 1) é o componente ativo da maioria dos repelentes de inseticidas comerciais. Em torno de 20% do DEET é absorvido via cutânea pela pele e metabolizada ou excretada (SUDAKIN; TREVATHAN, 2003), sendo encontrado em ambientes aquáticos devido os efluentes de esgoto (COSTANZO *et al.*, 2007). Os

repelentes são substâncias que afetam os receptores sensoriais dos insetos e outros organismos, interrompendo seu comportamento natural de serem atraídos por substâncias químicas secretadas pelos humanos e animais (CARSON, 2000; ANDRADE, 2008). Os repelentes protegem os seres humanos contra picadas de mosquitos, evitando a proliferação de doenças transmitidas por vetores (PAULA, 2004).

Figura 1. DEET (N,N dietil-3-metilbenzamida).



Fonte: ChemBioDraw Ultra 11.0 software.

O DEET é considerado de baixa toxicidade a saúde humana e apresenta propriedades físico-químicas como $\log P = 1,95$, $\log D = 2,5$ e pK_a menor que zero (SONG; BHADRA; JHUNG, 2017; BATHEJA *et al.*, 2009). As informações sobre a toxicidade do DEET são limitadas devido a poucos estudos de toxicidade aguda e a categoria que ele pertence, pois não requer uma avaliação ecológica de risco. Estudos mostram que o DEET é pouco tóxico para peixes, aves e invertebrados presentes em água. (ROBBINS; CHERNIACK, 1986; COSTANZO *et al.*, 2007; EPA, 1998).

Kim *et al.* (2007) empregaram a extração em fase sólida (SPE) como método de pré-concentração e a cromatografia líquida com espectrometria de massas com ionização por electrospray (LC-ESI-MS/MS) para determinar as concentrações de DEET em águas superficiais e efluentes de estações de tratamento da Coreia do Sul. O solvente utilizado na SPE foi metanol seguido por uma mistura de 10/90% de metanol/éter metil terc-butílico. Foi encontrada uma faixa de concentração de 6,4 a 60 ng L^{-1} nos efluentes e de 2 a 69 ng L^{-1} nas águas superficiais (KIM *et al.*, 2007).

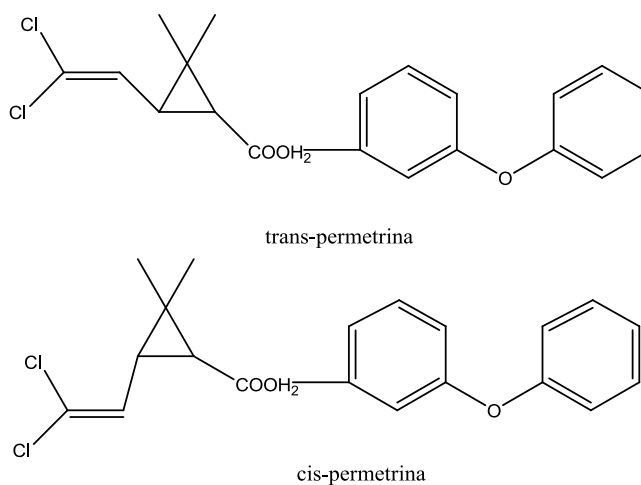
Ma, Ruixue *et al.* (2016) investigaram resíduos de vinte produtos farmacêuticos comumente usados pela população, entre eles o DEET, no lago Dongting, China. Eles também empregaram a SPE como método de pré-concentração e a análise por (LC-ESI-MS/MS). A faixa de concentração de DEET encontrada foi de 3,1 a 16,6 ng L^{-1} no lago a leste e de 2,7 a 6,6 ng L^{-1} no lago a oeste.

Mpupa *et al.* (2018) empregaram um método de nanoextração em fase sólida assistida por ultrassom (UA-SPNE) para a extração e pré-concentração de produtos de cuidados pessoais usando como nano adsorvente carbonos cerâmicos mesoporosos (MPC) $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-SiO}_2$. A análise foi feita por HPLC equipado com um detector por ultravioleta com arranjo de diodos (UV/DAD). Empregando esta metodologia, os autores reportaram limite de detecção (LOD) de $0,06 \mu\text{g L}^{-1}$ e limite de quantificação (LOQ) de $0,221 \mu\text{g L}^{-1}$ para o DEET. As amostras foram retiradas de águas residuais, rio e água da torneira da estação de tratamento de águas residuais de Daspoort (WWTP, Pretoria, Gauteng, África do Sul). A faixa de concentração de DEET encontrada foi de 2,8 a $100 \mu\text{g L}^{-1}$.

O emprego da eletroforese capilar foi descrito para a análise de seis pesticidas (orgânicos nitrogenados), sendo um deles o DEET, em águas de drenagem. Foi desenvolvido um método em cromatografia eletrocinética micelar (MEKC) combinado com a extração em fase sólida (SPE) e o *stacking* em campo amplificado (HE; Lee, 1997). He e Lee (1997) realizaram experimentos avaliando o método em MEKC para separação dos seis pesticidas, chegando à melhor condição: capilar de sílica fundida de 60 cm x $50 \mu\text{m}$ de comprimento total e 47 cm de comprimento efetivo, tampão tetraborato de sódio $12,5 \text{ mmol L}^{-1}$ contendo SDS 50 mmol L^{-1} , pH 9 ajustado com ácido fosfórico $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$. Detecção: UV 210 nm e tensão: 23 kV. Injeção hidrodinâmica 180 mbar. A condição para o MECK com o *stacking* em campo amplificado foi: amostra ser preparada em tampão diluído dez vezes, polaridade normal e injeção no modo hidrodinâmico com volume de injeção de 200 nL a 30 mbar (1,3 min). Empregando a MECK combinada com a SPE e o *stacking* em campo amplificado obteve a recuperação do DEET foi de 40%.

1.3 Permetrina

A permetrina, também conhecida como 3-phenoxibenzil(1*RS*)-*cis,trans*-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimmetilciclopropanocarboxilato (Figura 2) é um inseticida de contato eficaz contra uma ampla gama de pragas. Ela também auxilia no controle de mosquitos, baratas e outros insetos (ZWEIG; SHERMA, 1984).

Figura 2. Isômeros da permetrina

Fonte: ChemBioDraw Ultra 11.0 software.

A permetrina é de baixa toxicidade para mamíferos, tendo toxicidade aguda por via cutânea ou por via oral. A toxicidade aguda oral varia com a razão cis:trans da amostra, do portador e das condições utilizadas no estudo toxicológico (ZWEIG; SHERMA, 1984). A portaria de consolidação nº 5 de 28/11/2017 do Ministério da Saúde do Brasil estabelece a concentração de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ como limite máximo de resíduo (LMR) para a permetrina em água potável. A permetrina é pouco solúvel em água e apresenta propriedades físico-químicas como $\log P = 6,1$ e pK_a menor que zero (CARVALHO, 2010).

Šatínský, Dalibor *et al.* (2015) desenvolveram um método em SPE-HPLC on-line com detector de arranjo de diodos (DAD) para a determinação de permetrina em águas superficiais da República Tcheca. Eles utilizaram colunas de núcleo fundido para a extração em fase sólida em linha junto com a injeção de amostra em grande volume a fim de aumentar a sensibilidade de detecção. Foi encontrada uma faixa de concentração de cis-permetrina de 3 a 189 ng mL^{-1} e 9 a 540 ng mL^{-1} para a trans-permetrina. O limite de detecção (LOD) através do método utilizado para trans-permetrina foi de $2,7 \text{ ng mL}^{-1}$ e para cis-permetrina de $0,9 \text{ ng mL}^{-1}$.

Dalla Villa, Dore e Silva (2017) desenvolveram e validaram um método para determinação de agrotóxicos (sendo um deles a permetrina) em água, utilizando como técnica de pré-concentração a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) e cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas (GC-MS). As amostras de água foram coletadas nos rios Cuiabá e Coxipó e em uma lagoa localizada na Universidade Federal do Mato Grosso, todos localizados em Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. Os limites de detecção e quantificação foram de $25,82 \mu\text{g L}^{-1}$ e $82 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. No método de validação (DLLME e GC-MS) por meio das curvas analíticas obtidas por superposição matricial, foi determinado o

limite de detecção instrumental para a permetrina, que foi de $0,046 \mu\text{g L}^{-1}$ e o limite de quantificação instrumental, que foi de $2 \mu\text{g L}^{-1}$. Após validação, o método foi aplicado a amostras de água coletadas em região agrícola do Estado do Mato Grosso (água do Rio Cuiabá no município de Nobres). Nestas amostras, apenas a permetrina foi detectada. As amostras foram coletadas quando esses compostos são comumente usados, durante o período de cultivo do milho.

A eletrocromatografia capilar pressurizada (pCEC) é uma técnica de separação que combina a alta eficiência da eletroforese capilar (CE) e a alta seletividade do HPLC. Este modo de operação foi introduzido por Tsuda em 1987 e o arranjo instrumental é um sistema híbrido de micro-HPLC e CE utilizando bombas cromatográficas em um instrumento de CE, apresentando modificações no modo de injeção, utilizando injetores de HPLC (Segato *et al.*, 2009). Um método simples e rápido por eletrocromatografia capilar isocrática pressurizada (pCEC) foi desenvolvido para separar seis pesticidas piretróides, sendo um deles a permetrina. A metodologia foi empregada para a análise de resíduos de pesticidas em amostras de repolho chinês. Foi utilizado um sistema de eluição isocrática com as condições otimizadas: fase móvel: 40%, v/v de 10 mmol L^{-1} Tris; pH 8 e 60%, v/v ACN; detecção: UV 225 nm e tensão: -15 kV; pressão: 500 psi ; taxa de fluxo de $0,05 \text{ mL/ min}$. O limite de detecção foi de $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$ e o limite de quantificação foi de $0,8 \mu\text{g L}^{-1}$ (YE *et al.*, 2006).

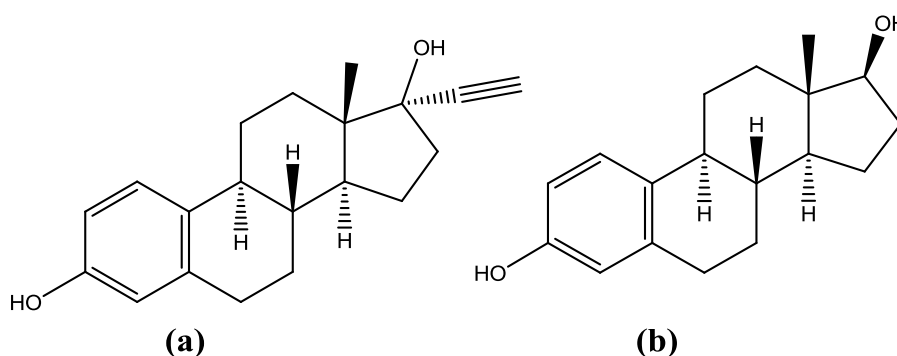
1.4 Hormônios

Alguns contaminantes emergentes são classificados como interferentes endócrinos. Os interferentes endócrinos também têm várias definições. Segundo Sodré *et al.*, 2007 e o Programa Internacional de Segurança Química, um interferente endócrino é classificado como “uma substância ou mistura exógena que altera a função do sistema endócrino e consequentemente causa efeitos adversos em um organismo intacto, ou em seus descendentes, ou subpopulações”. Segundo a definição da EPA, os interferentes endócrinos "interferem na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais no organismo responsáveis pela manutenção da homeostase (metabolismo celular normal), reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento." Estes interferentes endócrinos têm sido encontrados em águas superficiais devido à ineficiência dos processos de tratamento de efluentes e esgoto (SODRÉ *et al.*, 2007).

Alguns hormônios naturais e os sintéticos são classificados como interferentes endócrinos. Os hormônios naturais, como o 17β -estradiol e os sintéticos, como o 17α -

etinilestradiol podem ser excretados pela urina em suas formas biologicamente ativas e em menor proporção, por meio das fezes (FERNANDES *et al.*, 2011) (Figura 3). Sob condições naturais, esses metabólitos podem ser rapidamente hidrolisados, retornando a sua forma original (SODRÉ *et al.*, 2007). Estes contaminantes são encontrados tanto no esgoto tratado ou bruto.

Figura 3. Estrutura molecular do 17 α -etinilestradiol (a) e do 17 β -estradiol (b).



Fonte: ChemBioDraw Ultra 11.0 software.

O 17 β -estradiol é utilizado como aditivo em alimentos para bovinos e excretado principalmente por meio da urina. As principais fontes são por meio das criações industriais de animais (bovinos e suínos) e os efluentes das estações de tratamento de esgotos domésticos (FERNANDES *et al.*, 2011). O 17 α -etinilestradiol é o principal componente utilizado na produção de contraceptivos, sendo liberado em grandes quantidades por meio da urina (FERNANDES *et al.*, 2011). Apresenta propriedades físico-químicas como $\log P = 3,67$, $\log D = 3,98$ e $pK_a 10,4$ (25°C) (MONTAGNER e JARDIM, 2011; SCHLEICHER, 2013). As consequências deste contaminante no meio ambiente “podem ser observadas alterações bioquímicas e histopatológicas (fígado, gônadas e rins), modificações no processo reprodutivo e no desenvolvimento, mudanças comportamentais, entre outras.” (CUNHA, *et al.*, 2016). A modificação no processo reprodutivo (processo de feminização) é considerada a mais alarmante, “comprometendo o ciclo reprodutivo da população afetada, podendo desencadear desequilíbrio ao ecossistema no qual este se insere.” (CUNHA *et al.*, 2016).

Montagner e Jardim (2011), avaliaram 15 contaminantes emergentes em águas superficiais na bacia do rio Atibaia, entre eles o 17 α -etinilestradiol. Os compostos foram analisados por HPLC com detecção por DAD/fluorescência, empregando a SPE. O limite de detecção e de quantificação do 17 α -etinilestradiol foi de 17 ng L⁻¹ e 56 ng L⁻¹, respectivamente. De 26 amostras analisadas, o 17 α -etinilestradiol foi encontrado em 3 delas, numa faixa de concentração de 501 a 4390 ng L⁻¹.

Moreira *et al.* (2009), avaliaram a presença de 17α -etinilestradiol em águas superficiais utilizadas para abastecimento da Região Metropolitana de Belo Horizonte, MG, empregando a LC-MS. O LOD para o 17α -etinilestradiol foi de 0,9 ng/L. O 17α -etinilestradiol foi detectado em uma faixa de concentração de 3 a 54 ng L⁻¹ nas amostras.

Torres *et al.* (2015), também empregaram a LC-MS para avaliar a presença de 17α -etinilestradiol no rio Piracicaba/SP. Os autores reportaram LOD 0,7 ng L⁻¹ e LOQ 7 ng L⁻¹ para o 17α -etinilestradiol. A faixa de concentração encontrada foi de 24 a 480 ng L⁻¹.

Alguns trabalhos têm empregado o modo MEKC para análise de hormônios (CHENG; TSAI, 2011; BYKOVA; HOLLAND, 2008; LIU; JIA, 2008; COLLIER *et al.*, 2006; SIRÉN; SEPPÄNEN-LAAKSO; OREŠIČ, *et al.*, 2008; SOMSEN; MOL; DE JONG, 2010). Cheng e Tsai (2011) empregaram a MEKC combinada ao *sweeping* para a separação simultânea de seis esteroides. A condição otimizada foi: tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ (pH 7,0) contendo SDS 40 mmol L⁻¹, ciclodextrina (CD) 10 mmol L⁻¹ e metanol 4% (v/v); temperatura ambiente, tensão 25 kV, tempo de injeção 3 segundos, detector UV 220 nm. Concentração da amostra: 50 g mL⁻¹ de cada padrão dissolvido em metanol. A condição para *sweeping* foi: tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ (pH 7,0), SDS 80 mmol L⁻¹, CD 14 mmol L⁻¹ e metanol a 4% (v / v). Tempo de injeção: 600 s. Concentração da amostra: 1 g mL⁻¹ de cada padrão dissolvido em tampão fosfato.

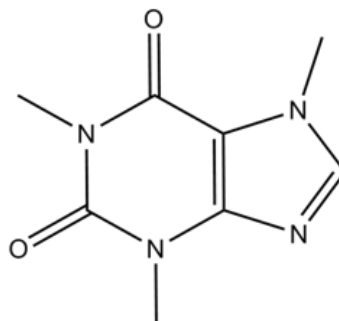
D'Orazio *et al.* (2014), empregaram a cromatografia micelar eletrocínética (MEKC) acoplada à espectrometria de massas para determinar 12 compostos estrogênicos. Eles usaram como eletrólito um surfactante volátil, o ácido perfluorooctanoico (PFOA) 45 mmol L⁻¹ (ajustado a pH 9.0 com uma solução de amônia), contendo 10% metanol (v/v). Foi empregada como técnica de pré-concentração a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) usando clorofórmio e acetonitrila como solventes de extração e dispersão, respectivamente. Os limites de detecção encontrados foram na faixa de 0,41 a 0,91 µg L⁻¹ para o 17α -etinilestradiol. A recuperação foi de 78%, 73% e 57% para água mineral, água de escoamento e água residuais, respectivamente. A metodologia foi empregada em amostras de águas minerais, água de escoamento e água residuais de diferentes áreas da ilha de Tenerife (Ilhas Canárias, Espanha), não tendo sido encontrados resíduos de estrogênios em nenhuma delas.

1.5 Cafeína

A cafeína é um alcalóide, identificado como 1,3,7-trimetilxantina. Ela é encontrada em grande quantidade nas sementes de café, nas folhas de chá verde, no cacau, no guaraná e na erva-mate. É encontrada na forma de fármacos e em algumas bebidas (DE MARIA;

MOREIRA, 2007). A cafeína apresenta propriedades físico-químicas como pKa de 0,6 a 14 e $\log P = 0,01$ (Hansch *et al.*, 1990). A estrutura química é apresentada na figura 4.

Figura 4. Cafeína.



Fonte: ChemBioDraw Ultra 11.0 software.

O consumo moderado de cafeína não apresenta riscos à saúde dos seres humanos. Ela é uma das substâncias mais consumidas na forma de bebidas ou fármacos (DE MARIA; MOREIRA, 2007). A cafeína tem elevada solubilidade em água e resistente aos processos de tratamento nas estações de tratamento de água (ETA) o que justifica utilizar como indicador de contaminação antrópica em diversos estudos (CANELA *et al.*, 2014). Pesquisas demonstraram a presença de cafeína em ambientes aquáticos naturais; este fato está diretamente relacionado ao tratamento do esgoto (SODRÉ *et al.*, 2007; MONTAGNER; JARDIM, 2011).

Sodré *et al.* (2007), avaliaram a presença de cafeína em águas superficiais da região de Campinas (SP/Brasil) utilizando HPLC acoplada a dois detectores (ultravioleta (UV) e fluorescência (FL,RF-10A XL), empregando a SPE. O LD para a cafeína foi de $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$ utilizando o detector UV. A concentração de cafeína encontrada nas amostras foi em torno de $13,1$ e $8,46 \mu\text{g L}^{-1}$.

Montagner e Jardim (2011) utilizaram também a SPE e a HPLC com detecção por ultravioleta com arranjo de diodos (UV/DAD) ou fluorescência (FLD). As amostras foram coletadas na bacia do rio Atibaia (Campinas-SP, Brasil) e monitoradas espacialmente e sazonalmente. Para a cafeína, o limite de detecção (LOD) foi de 11 ng L^{-1} e o limite de quantificação (LOQ) foi de 38 ng L^{-1} . A faixa encontrada no rio foi de 127 a 174 ng L^{-1} .

1.6 Legislação

Diversas classes de contaminantes emergentes são utilizadas no cotidiano sem se conhecer quais os efeitos que elas podem causar ao meio ambiente ou aos seres vivos. Caso

elas causem algum efeito indesejável, provavelmente se passarão muitos anos até que sejam identificados. Portanto, a mitigação e remediação desses efeitos devem ser melhorados.

Ao longo dos últimos anos houve um aumento do número de substâncias que são contempladas na legislação brasileira e mundial (no que cerne ao solo, ar e na potabilidade da água). Entretanto contemplar todas as substâncias que tem algum efeito indesejável para o meio ambiente e aos seres vivos, devido à grande produção de novos produtos. A pesquisa e a avaliação sobre os efeitos indesejáveis demandam mais tempo que o desenvolvimento e produção de novos produtos (CANELA *et al.*, 2014).

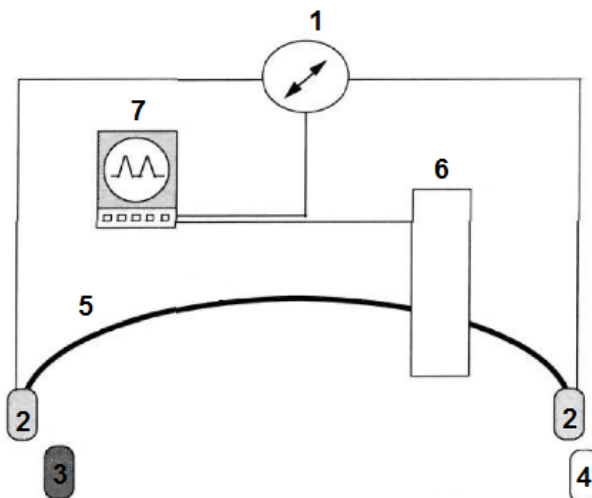
A legislação para os novos contaminantes serem regulamentados envolve o trabalho de diversas áreas do conhecimento. No caso dos contaminantes emergentes, por não terem uma lei e regulamentos sanitários que exijam o tratamento da água, muitas dessas substâncias acabam retornando ao consumo humano. Nesse sentido, Jardim “afirma haver tecnologia para remoção de boa parte dos contaminantes emergentes, no entanto, atenta para fato de que estas medidas não detém o mesmo arrimo que as concessionárias possuem ao fazer o tratamento das águas e esgoto, amparo este, disposto em regulamentações como portaria do Ministério da Saúde (MS2914/2011)” (JARDIM, 2013).

Na legislação brasileira, as agências ambientais atendem à portaria de consolidação nº 5 de 28/11/2017 do Ministério da Saúde, que estabelece os padrões para água destinada ao consumo humano, mas nela não estão contemplados todos os contaminantes deste estudo apenas a permetrina com um limite máximo de 20 µg/L. Por sua vez, é a resolução da CONAMA (430/2011), que estabelece as condições e padrões de lançamentos de efluentes, bem como as diretrizes ambientais para classificar os corpos de água.

1.7 Eletroforese Capilar (CE)

A CE é uma técnica de separação que envolve a migração diferenciada de compostos iônicos, ionizáveis ou neutros, sob aplicação de um campo elétrico (TAVARES, 1996). A eletroforese capilar (Figura 5) é considerada a terceira grande técnica instrumental de separação, seguida pela HPLC e CG. Isso se deve às várias vantagens oferecidas pela técnica, em especial os vários modos de separação, que possibilitam a análise de uma grande diversidade de compostos iônicos e neutros (TAVARES, 1997). Outras vantagens incluem o uso de volumes reduzidos (nL) de amostra, geração de pouco resíduo, alta resolução, alta seletividade, ser compatível com diversos sistemas de detecção, custo reduzido, entre outros (TAVARES, 1996).

Figura 5. Esquema da técnica de eletroforese capilar.

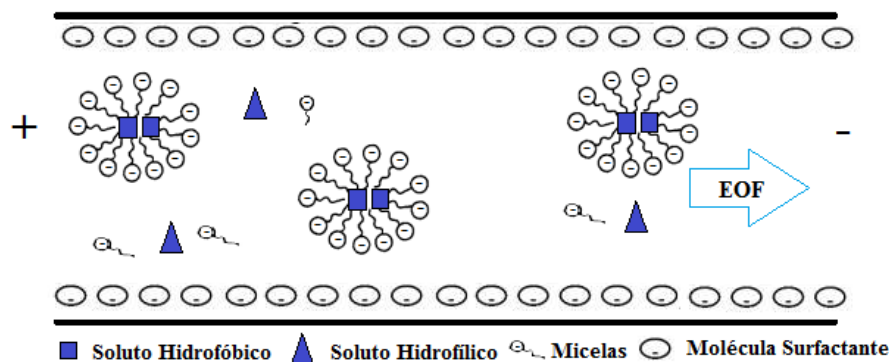


Legenda: 1) Fonte de alta tensão, 2) reservatórios para tampão, 3) reservatórios para amostra, 4) reservatório vazio, 5) capilar, 6) detector, 7) computador. Fonte: Adaptado de ALTRIA, 1996.

A análise de compostos iônicos é realizada no modo da eletroforese capilar em solução livre (FSCE), que é o modo mais simples da CE. O capilar é previamente preenchido com o eletrólito de corrida e a amostra é injetada. A tensão é aplicada gerando um campo elétrico que faz os analitos migrarem para zonas distintas. Ocorrendo a separação dos analitos devido à diferença de mobilidade (composição da mobilidade eletroforética e a eletrosmótica) (SPUDEIT *et al.*, 2012).

A análise de compostos neutros é realizada no modo MEKC. Neste modo, agentes tensoativos iônicos são adicionados ao tampão de corrida em condições que propiciem a formação de micelas, proporcionando assim um sistema cromatográfico de duas fases (TAVARES, 1997). As micelas representam a fase secundária que pode incorporar os compostos apolares. A superfície dessas micelas iônicas apresenta alta carga negativa, tendo uma alta mobilidade eletroforética. Os componentes de uma amostra adicionada neste sistema irão se distribuir nas duas fases (aquosa e micelar), dependendo da sua polaridade. Nos compostos polares é favorecida a fase aquosa, enquanto que para compostos apolares é preferida a fase micelar. Essa partição diferenciada dos compostos é responsável pela seletividade da separação (SKOOG; WEST; HOLLER; CROUCH, 2006).

Figura 6. Esquema representativo da separação por MEKC usando micelas aniônicas



Fonte: Adaptado de FRAZIER; AMES; NURSTEN, 2007.

1.8 - Estratégias de pré-concentração “on line”

Devido ao pouco consumo de solventes orgânicos e a baixa geração de resíduos, a CE é considerada uma *green technique*, sendo uma técnica muito interessante em análises ambientais. Porém, ela apresenta baixa sensibilidade para análise de concentrações no nível de traços, especialmente quando se usa o detector UV-DAD. Isto ocorre devido ao volume reduzido de injeção (da ordem de nano litros) e o pequeno caminho óptico (definido pelo diâmetro do capilar). Neste sentido, a busca por estratégias de pré-concentração *on-line* que possibilitem melhorar os limites de detecção em CE é constante (DABEK-ZLOTORZYNSKA; CELO, 2006).

As estratégias de pré-concentração on-line são baseadas em princípios químicos, físicos e físico-químicos usados para pré-concentrar os analitos. Elas envolvem parâmetros como: composição da amostra ou tampão ou eletrólito de corrida em conjunto com o modo de injeção, não havendo a necessidade de alterar a instrumentação, apenas modificando a preparação da amostra ou tampão ou eletrólito de corrida e os parâmetros (injeção, tensão e polaridade) no software do equipamento. Entre estas, as estratégias de *stacking* tem apresentado um ganho considerável em detectabilidade (MORAES; TAVARES; PEREIRA, 2010; MORAES *et al.*, 2009)

O *stacking* (empilhamento) é uma estratégia para pré-concentrar os analitos e melhorar a resposta dos analitos. As estratégias de *stacking* podem ser empregados tanto para os compostos iônicos (MORAES *et al.*, 2009) quanto para os neutros (MORAES; TAVARES; PEREIRA, 2010). Para os compostos neutros, analisados em modo MECK, a pré-concentração se dá pela manipulação da velocidade da fase dispersa/secundária, sendo as estratégias de *stacking* divididas pelo modo da injeção. Nos casos em que a injeção é hidrodinâmica, as amostras podem ser preparadas em água ou meio micelar de baixa

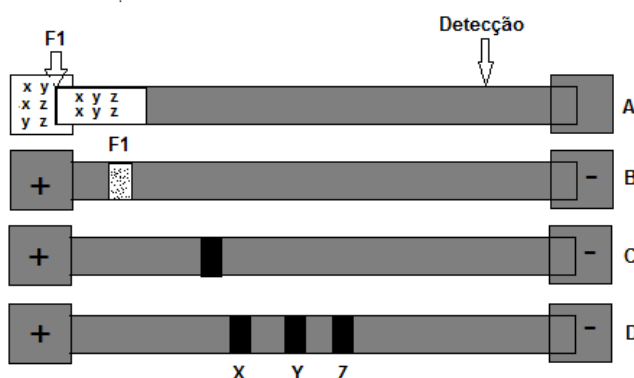
condutividade e são injetadas com a polaridade da fonte de alta tensão normal (positiva) ou invertida (negativa). No caso da injeção eletrocínética, as amostras são preparadas somente em meio micelar de baixa condutividade. Após a injeção de um pequeno volume de água, a injeção da amostra é feita com polaridade negativa (MORAES; TAVARES; PEREIRA, 2010).

1.8.1 - *Stacking* em modo normal (SMN)

O mecanismo de *stacking* em meio micelar mais simples e rápido a ser realizado é o *stacking* em modo normal (SMN), que é feito pelo modo de injeção hidrodinâmica. Porém, esta estratégia produz alargamento dos picos e perda da resolução. Devido o tempo de injeção da amostra ser alto (superior a 40s) (MORAES; TAVARES; PEREIRA, 2010).

A amostra é preparada em meio aquoso e a injeção é por um longo tempo (20 a 40s), posteriormente o capilar é preenchido completamente com eletrólito de corrida (solução básica ou neutra) contendo o tensoativo aniônico (Figura 7A). Após a aplicação de tensão positiva, as micelas do eletrólito que estão no polo negativo migram em direção ao polo positivo entrando na zona da amostra. Devido à baixa condutividade da região as micelas são aceleradas carregando os analitos em direção à fronteira F1 (Figura 7B). Elas são desaceleradas causando uma contração da zona da amostra e pré-concentrando os analitos neutros (Figura 7C). Como o fluxo eletrosmótico é maior do que a migração eletroforética das micelas, isto faz com que as micelas também se movam em direção ao detector, ocorrendo a separação das bandas (Figura 7D) (MORAES; TAVARES; PEREIRA, 2010). O esquema do *stacking* em modo normal (SMN) é apresentado na Figura 7.

Figura 7. Modelo de *stacking* em modo normal (SMN).



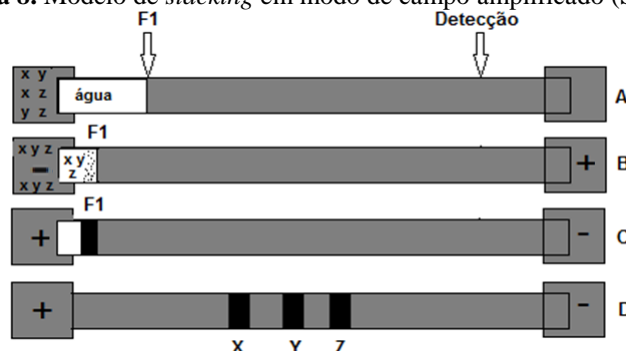
Legenda: A. Injeção de grande volume de amostra; B. Aplicação da tensão positiva e migração das micelas; C. Pré-concentração dos analitos; D. Separação dos analitos. Fonte: Adaptado de MORAES; TAVARES; PEREIRA, 2010.

1.8.2 - *Stacking* em modo de campo amplificado (SMCA)

A injeção da amostra para *stacking* em modo de campo amplificado (SMCA) é feita pelo modo de injeção eletrocinético. As etapas dos mecanismos envolvidos na SMCA estão descritos na Figura 8 (MORAES; TAVARES; PEREIRA, 2010).

Neste *stacking* a amostra é preparada em meio micelar de baixa condutividade, sendo injetada no capilar em modo eletrocinético utilizando polaridade negativa, após a injeção de um grande volume de água (Figura 8A). Na banda da água (meio de baixa condutividade) ocorre a formação de um alto campo elétrico, após a aplicação da tensão. As micelas do eletrólito que estão no polo negativo migram em direção ao polo positivo entrando na zona da água. Os analitos que estão dissolvidos nas micelas, entram em contato com a zona de água. Devido à baixa condutividade da região as micelas são aceleradas carregando os analitos em direção à fronteira F1 (Figura 8B). Elas são desaceleradas e migram em direção ao polo negativo. O valor da corrente deve ser monitorado, pois assim que atingir 97-99% do valor inicial, toda a banda de água é removida e a polaridade é invertida (Figura 8C). Os analitos pré-concentram em uma banda fina nesta região, ocorrendo à separação (F1. Figura 8 D).

Figura 8. Modelo de *stacking* em modo de campo amplificado (SMCA).



Legenda: A. injeção de grande volume de água seguida pela injeção da amostra preparada em meio micelar; B. Aplicação da tensão negativa e pré-concentração na fronteira F1; C. A polaridade é invertida quando o valor da corrente atingir de 97 a 99% do valor inicial; D. Separação dos analitos. Fonte: Adaptado de MORAES; TAVARES; PEREIRA, 2010.

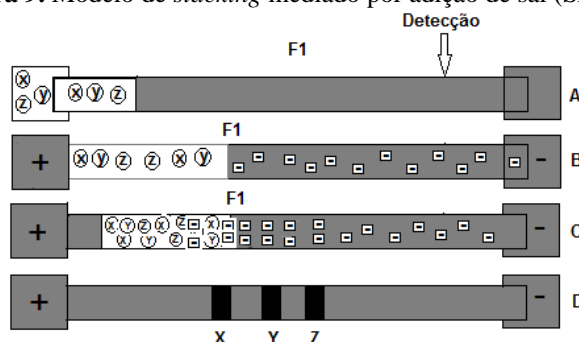
1.8.3 - *Stacking* mediado por adição de sal (SMAS)

O *stacking* mediado por adição de sal ocorre a partir do *stacking* das micelas, envolvendo a manipulação da força iônica. Os compostos neutros não tem mobilidade eletroforética, portanto o *stacking* ocorre devido à baixa força iônica do eletrólito de corrida contendo as micelas, gerando o *stacking* das micelas.

Este *stacking* é promovido por um aumento da condutividade da amostra através da adição de uma quantidade apropriada de sal (Figura 9A). Após a aplicação de tensão positiva na amostra, ocorre um baixo campo elétrico na zona da amostra e um alto campo elétrico na

zona do eletrólito (Figura 9B). As micelas (com carga negativa) migram em direção ao polo positivo e diminuem a velocidade na fronteira (F1) entre a amostra e o eletrólito, causando o *stacking* nesta área (Figura 9C). Quando as micelas entram na zona da amostra, capturam os analitos neutros. O fluxo eletrosmótico é o que transporta as bandas dos analitos pré-concentrados ao detector (Figura 9D) (MORAES; TAVARES; PEREIRA, 2010).

Figura 9. Modelo de *stacking* mediado por adição de sal (SMAS).

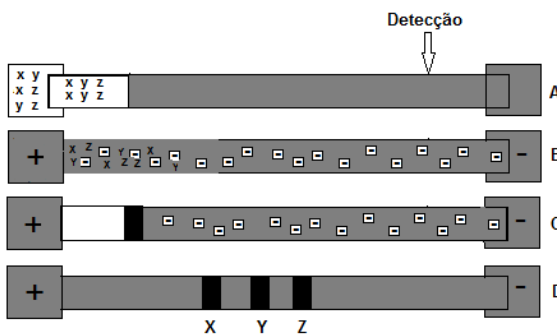


Legenda: A. Injeção da amostra dissolvida em sal; B. Aplicação da tensão; C. Pré-concentração na F1; D. Separação dos analitos. Fonte: Adaptado de MORAES; TAVARES; PEREIRA, 2010.

1.8.4 - *Sweeping*

O *sweeping* é uma estratégia de pré-concentração on-line que tem uma fase pseudo-estacionária. Ao aplicar a tensão, essa fase penetra na zona da amostra e captura e acumula as moléculas do analito. Podendo ser utilizado tanto na presença e ausência de fluxo eletrosmótico (MORAES; TAVARES; PEREIRA, 2010).

O método proposto neste trabalho foi o *sweeping* na presença de fluxo eletrosmótico. Este método baseia-se na injeção da amostra (preparada com eletrólito de corrida, sem micelas) por um longo tempo (acima de 40 segundos) (Figura 10A). Após a aplicação de tensão positiva na amostra, as micelas do eletrólito que estão no polo negativo migram em direção ao polo positivo entrando na região da amostra (Figura 10B). As micelas arrastam (varredura) os analitos neutros sejam concentradas em uma banda fina (Figura 10C). Como o fluxo eletrosmótico é maior do que a migração eletroforética das micelas, isto faz com que as micelas e os analitos neutros dissolvidos nelas também se movam em direção ao detector. Ocorrendo a separação das bandas (Figura 10D).

Figura 10. Modelo de *sweeping* na presença de EOF.

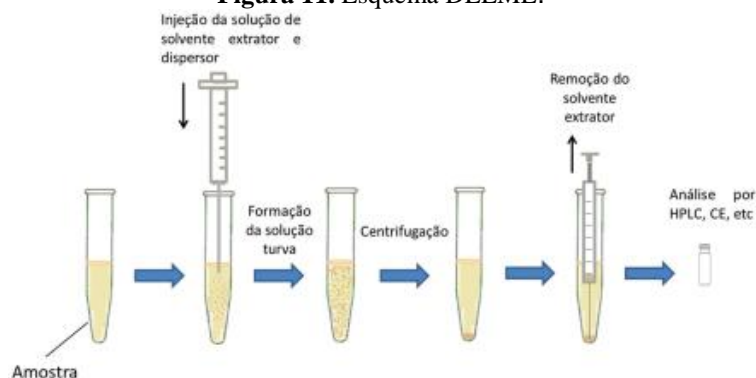
Legenda: A. injeção da amostra com a mesma condutividade que o eletrólito; B. Aplicação da tensão; C. Pré-concentração n; D. Separação dos analitos. Fonte: Adaptado de MORAES; TAVARES; PEREIRA, 2010.

1.9 - Estratégias de pré-concentração “off-line”

A estratégia de pré-concentração *off-line* ocorre separadamente do sistema cromatográfico. A amostra é preparada utilizando a pré-concentração *off-line* e, após este preparo, é introduzida no sistema cromatográfico (QUEIROZ *et al.*, 2001). Dentre essas estratégias, destacam-se a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME), microextração em fase sólida (SPME) e a microextração em fase líquida (LPME).

1.9.1 - Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)

A técnica de microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) é o método onde se mistura um solvente de extrator (imiscível em água) com um solvente dispersor (miscível em água e no solvente extrator). Esta mistura de solventes é então rapidamente injetada com uma seringa adequada numa amostra aquosa contendo os analitos de interesse, causando uma turbulência na mistura e ocorrendo a formação de microgotas da mistura do solvente extrator e o dispersor na amostra (Figura 11). Formando o ponto nuvem. A área superficial entre o solvente extrator e amostra aquosa torna-se muito grande, portanto o equilíbrio de partição é atingido rapidamente, diminuindo o tempo de extração e este efeito sendo a principal vantagem do DLLME (QUIGLEY; CUMMINS; CONNOLLY, 2016; MAHUGO-SANTANA *et al.*, 2011).

Figura 11. Esquema DLLME.

Fonte: MOREIRA; YOKOYA; GAITANI, 2014.

As fases desta solução são separadas por centrifugação na qual as microgotas são sedimentadas e posteriormente com uma microseringa são retiradas para sua posterior análise. Existem várias condições importantes a serem observadas para garantir maior eficiência de extração, tais como tipos de solvente (tanto o extrator como o dispersor), volumes de solventes de extrator e dispersor, força iônica e pH da amostra e tempo de extração e centrifugação (WEN *et al.*, 2012). Estas condições devem ser observadas, pois afetam significativamente a eficiência de extração. Maior eficiência na DLLME significa um maior fator de pré-concentração, obtendo limites de detecção e quantificação menores.

A DLLME tem um potencial de aplicação para diversos campos (ambientais, alimentares, farmacêuticos e entre outros) e vários grupos de substâncias orgânicas e inorgânicas. É vantajoso devido a fatores como rapidez, baixo custo, simplicidade, alta eficiência de extração e pouco consumo de solventes orgânicos (ALVES, *et al.*, 2016).

Wei *et al.* (2016), desenvolveu um método simples, rápido e sensível utilizando a microextração líquido-líquido dispersiva assistida por ultrassom (UADLLME) combinado com a cromatografia eletrocinética micelar (MEKC) utilizando a estratégia de pré-concentração on-line *sweeping* para determinação de nove pesticidas orgânicos fosforados em plantas medicinais e vegetais. Houve um ganho de até 6203,5 vezes na sensibilidade da concentração usando o método com a combinação com técnicas de pré-concentração off-line e on-line em comparação com o método MEKC normal.

Chen; Chen; Chang (2018), desenvolveram uma nova versão da microextração líquido-líquido dispersiva, a microextração líquido-líquido dispersiva assistida por ciclodextrina, combinado com a cromatografia eletrocinética micelar e estratégia *sweeping* para a pré-concentração e detecção sensível de carbamazepina e clobazam. Obteve uma faixa de concentração de 2,0–200,0 ng / mL. Os limites de detecção do método na relação sinal-

ruído de 3 foram 0,6 e 0,5 ng / mL com fatores de aumento de sensibilidade de 3575 e 4675 para carbamazepina e clobazam, respectivamente.

Para aumentar a eficiência de pré-concentração e detecção da análise de matrizes complexas se torna adequado combinar a DLLME e CE. Devido ao menor volume de solvente de extração usado na DLLME e ao pequeno volume de amostra necessário para o CE. A interferência da matriz da amostra pode ser eliminada pela DLLME. A combinação DLLME e CE pode expandir as aplicações de CE-UV na análise de traços (CHEN; CHEN; CHANG, 2018).

1.10 Justificativa

O aumento da poluição nas águas superficiais e subterrâneas por contaminantes emergentes tem afetado tanto a vida aquática quanto do ser humano. Os contaminantes emergentes ainda não estão contemplados na legislação brasileira e apesar do risco socioambiental que eles oferecem, ainda não existem limites oficiais para sua análise. As legislações atuais não estabelecem níveis ou regulamentações para a contaminação de hormônios nas águas superficiais ou tratadas no Brasil (TORRES *et al.*, 2015). Os processos de tratamento de água e esgoto não conseguem remover esses contaminantes (SILVA *et al.*, 2016).

A eletroforese capilar é uma poderosa técnica de separação com várias vantagens, tais como baixo consumo de solvente e amostra (*green analytical technique*), tempo de análise curto e alta eficiência de separação. O uso de técnicas de pré-concentração acopladas em CE tem melhorado os limites da técnica para análises ambientais, visto que os contaminantes em água estão em baixos níveis e concentração. O emprego de métodos de pré-concentração off-line, em conjunto com os métodos on-line (stacking) permitem atingir limites aceitáveis para o emprego da técnica em análises de monitoramento ambiental destes contaminantes. A combinação de DLLME e CE é particularmente atraente devido aos baixos volumes de injeção necessários (apenas alguns nL versus L para análise LC), gerando pouco resíduo e o custo da análise no CE ser menor do que em LC ou MS (MENG *et al.*, 2011; KOHLER *et al.*, 2013).

2. Objetivo Geral

O presente estudo teve como objetivo avaliar métodos de pré-concentração “on-line” e “off-line” para a análise de DEET, permetrina, cafeína e 17 α -etinilestradiol, utilizando as técnicas de eletroforese capilar e cromatografia líquida.

2.1 Objetivos específicos

- Desenvolver, otimizar e validar um método de separação em eletroforese capilar e em HPLC para a separação de DEET, permetrina, cafeína e 17 α -etinilestradiol.
- Avaliar as estratégias de pré-concentração “on-line” em eletroforese capilar (para analitos neutros): *stacking* em campo amplificado, *stacking* em modo normal, *stacking* mediado por sal e *sweeping*, nos compostos em estudo.
- Desenvolver e validar a pré-concentração "off-line" de microextração em fase líquida dispersiva (DLLME) para os compostos, otimizando os solventes extratores e dispersores.
- Comparar as diferentes estratégias de pré-concentração e aplicar as que apresentaram melhor resultado na análise destes contaminantes.

3. Parte Experimental

3.1 Material

Os equipamentos utilizados nas análises foram: Eletroforese Capilar modelo PA800 Plus, Beckman Coulter, (Fullerton, CA, USA), equipado com detector DAD/UV-Vis e fluorescência induzida a laser, biblioteca de espectros, termostatizador para amostras, fonte de alta tensão, computador e software. Capilar de sílica fundida de 40,2 cm de comprimento total e 30 cm de comprimento efetivo (até o detector) e 75 μ m de diâmetro. Cromatógrafo em fase líquida de alta eficiência LC-20A Prominence Shimadzu (Kyoto, Japão), equipado com coluna Hypersil BDS - C₁₈ (250 mm x 4.6 mmid, 5 μ m) e detectores UV com arranjo de diodos e fluorescência.

3.2 Métodos

3.2.1 Cromatografia em fase líquida de alta eficiência (HPLC)

Inicialmente otimizou-se as condições em HPLC para a separação de DEET, permetrina e 17 α -etiniltestradiol usando uma coluna do tipo C₁₈ de 5 μ m, (250 x 4,6 mm). Fase móvel: modo gradiente constituído de ACN/H₂O na proporção 50:50 (v/v) até 15 min, seguido de ACN/H₂O na proporção 95:5 (v/v) até 30 min. A detecção foi efetuada empregando o detector UV: (λ_{max}) = 220 nm; e de fluorescência λ_{ex} = 280 nm e λ_{em} = 310 nm. Vazão: 1 mL min. Temperatura: 25 \pm 2°C. Volume de injeção: 20 μ L.

O método foi otimizado novamente para quantificar e separar todos os 4 compostos. A condição otimizada do gradiente de fase móvel foi: ACN/H₂O na proporção 45:55 (v/v) até 8 min seguido da proporção 95:5 (v/v) até 18 min. As demais condições foram mantidas.

3.2.2 Pré-concentração “off-line” (DLLME)

Para a DLLME, partiu-se inicialmente das condições desenvolvidas anteriormente em nosso grupo, utilizando acetonitrila (solvente dispersor) e clorofórmio (solvente extrator) com grau de pureza para HPLC (PARENTE, 2016). Utilizou-se uma microseringa (Hamilton 80865) de 500 µL para injetar bruscamente a mistura dos solventes extrator (100 µL) e dispersor (350 µL) em 5 mL de amostra contendo os analitos em triplicata e em 5 mL de água também em triplicata. As amostras foram agitadas em um vórtex (QL-901) e as fases desta solução foram separadas por centrifugação numa centrífuga Z326K (*Hermle Labortochinik GmbH, Z326K, Alemanha*) a 4000 rpm por 5 min. Para retirar a fase sedimentada foi utilizada uma microseringa (Agilent) de 100 µL e as amostras foram submetidas à secagem a vácuo (Speed Vac eppendorf concentrator 5301) e dissolvidas em água (100 µL). O preparo da amostra para DLLME foi realizado tomando 5 mL de água ultrapura (Milli-Q) contendo os padrões de DEET (6,62 mg L⁻¹), 17α-etinilestradiol (1,12 mg L⁻¹) e permetrina (1,22 mg L⁻¹) e cafeína (1 mg L⁻¹).

Aplicou-se nesta condição, em triplicata, cinco soluções de diferentes concentrações dos compostos (cafeína, 17α-etinilestradiol, DEET e permetrina): 10 mg L⁻¹, 5 mg L⁻¹, 2,5 mg L⁻¹, 1 mg L⁻¹, 500 ng L⁻¹ e 250 ng L⁻¹ para que fosse possível determinar as figuras de mérito: linearidade, limite de detecção e quantificação.

3.2.3 Recuperação, limite de detecção e quantificação e fator de enriquecimento

A recuperação é expressa pela proporção da quantidade da substância de interesse que é extraída (DLLME) e pode ser quantificado (RIBANI *et al.*, 2004). Calcula pela relação entre a concentração (área de cada pico) média na DLLME e a média da concentração dos padrões, utilizando a equação 1 (ANVISA, 2017).

$$Recuperação = \frac{Concentração\ média\ (DLLME)}{Concentração\ média\ (Padrão)} \times 100 \quad (1)$$

O limite de detecção (LD) deve demonstrar a obtenção da menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado. O cálculo é feito a partir da relação do desvio padrão com a inclinação da curva de calibração (RIBANI *et al.*, 2004; ANVISA, 2017). Sendo expresso pela equação 2.

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{IC} \quad (2)$$

Onde s é o desvio padrão e IC é a inclinação da curva calibração.

O limite de quantificação (LQ) deve representar a menor quantidade do analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis. O cálculo é feito a partir da relação do desvio padrão com a inclinação da curva de calibração (RIBANI *et al.*, 2004; ANVISA, 2017). Sendo expresso pela equação 3.

$$LQ = 10 \times \frac{s}{IC} \quad (3)$$

Onde s é o desvio padrão e IC é a inclinação da curva calibração.

O fator de enriquecimento é um dos parâmetros mais empregados para analisar a eficiência dos sistemas de pré-concentração e processos de microextração em fase líquida, como no caso da DLLME (CALDAS *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2016). É calculado a partir da equação 4.

$$E = R \frac{V_a}{V_{ext}} \quad (4)$$

Onde: E: fator de enriquecimento; $V_{amostra}$ = volume da amostra; V_{ext} = volume do solvente extrator; R = recuperação.

3.2.4 Eletroforese Capilar (CE)

A CE foi utilizada no modo MEKC. Para otimizar a separação foram testados diversos eletrólitos e várias concentrações do tensoativo dodecil sulfato de sódio (SDS), incluindo acetonitrila (ACN) e metanol (MeOH) como aditivo. No início do dia, o capilar era condicionado com NaOH 1 mol L⁻¹ durante 5 min, seguido de água deionizada por 5 minutos e pelo eletrólito por 10 min. Durante as corridas, as lavagens consistiram de solução de NaOH 1,0 mol L⁻¹ por 1 min, água deionizada por 1 min e eletrólito por 3 min. Para finalizar as corridas, a lavagem consistia de solução de NaOH 1,0 mol L⁻¹ por 5 min, seguida de água deionizada por 5 min.

As condições analíticas otimizadas foram: capilar de sílica fundida de 40,2 cm de comprimento total e 30 cm de comprimento efetivo, tampão tetraborato de sódio 30 mmol L⁻¹ (pH 9,2) contendo SDS 40 mmol L⁻¹ sem aditivos. Temperatura 25°C, detecção: UV 220 nm e 280 nm e tensão: 15 kV. Injeção hidrodinâmica (0,5 psi por 3 s).

3.2.5 Pré-concentração “on-line” (*stacking* e *sweeping*)

Para o *stacking* em modo normal (SMN) foi utilizada a injeção hidrodinâmica. A separação foi conduzida nas condições otimizadas. A amostra foi injetada por pressão durante 10s, 15 e 20 segundos. Para o *stacking* em modo campo amplificado, primeiro foi injetada uma banda de água (0,5 psi por 10 s) e a seguir injetada a amostra por injeção eletrocinética (5 kV durante 20 s). O *stacking* mediado por sal foi realizado adicionando uma solução de 300 mmol L⁻¹ de NaCl no mix dos padrões. A amostra foi injetada por injeção hidrodinâmica (0,5 psi por 15 s) nas mesmas condições que o *stacking* em modo normal e a amostra sem *stacking*. Na estratégia de *sweeping*, a amostra (preparada em uma solução de 50 mmol L⁻¹ de borato, sem micelas) foi injetada por injeção hidrodinâmica por um longo tempo (05 psi, por mais de 40 s).

4. Resultados e Discussão

4.1 Cromatografia em fase líquida de alta eficiência (HPLC)

Inicialmente partiu-se de um método em HPLC já desenvolvido em nosso grupo para os inseticidas: DEET e permetrina (PARENTE, 2016). As condições originais foram otimizadas para a separação dos dois inseticidas conjuntamente com mais duas classes de compostos, um hormônio (17 α -etinilestradiol) e um alcaloide (cafeína). Foi utilizado também o detector de fluorescência, devido o 17 α -etinilestradiol apresentar alta fluorescência. O método foi otimizado no modo gradiente.

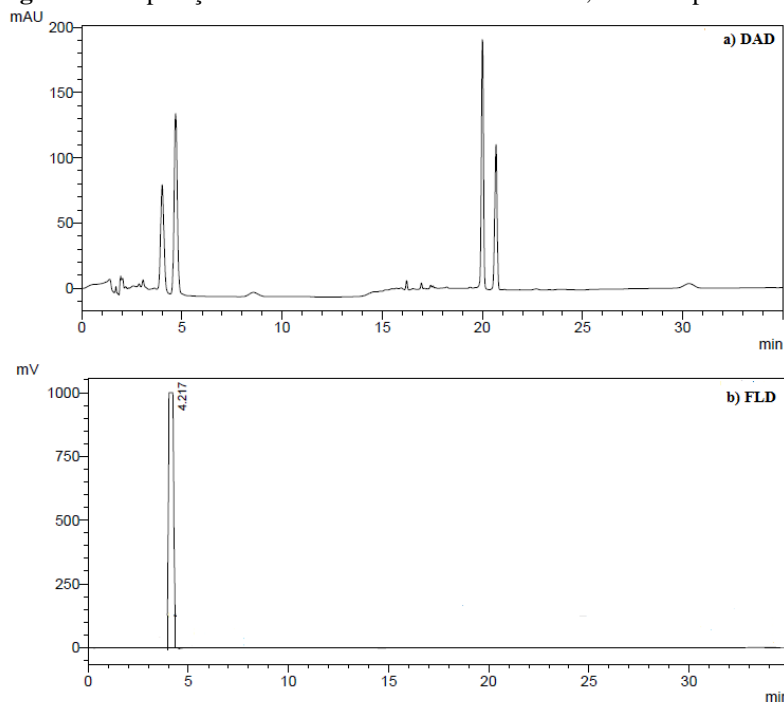
4.1.1 Determinação simultânea da permetrina, DEET e 17 α - etinilestradiol utilizando DLLME-HPLC-UV-FLD

Partindo-se das condições iniciais para separação de DEET e permetrina, adicionamos primeiramente o 17 α - etinilestradiol na mistura de padrões. Foram otimizadas as condições de separação em HPLC para os 3 compostos. Foi observada boa separação dos analitos, com um limite de quantificação de ≈ 10 mg L⁻¹. Não houve co-eluição, o que prejudicaria a quantificação dos analitos. Como o 17 α -etinilestradiol apresenta uma alta fluorescência, ele foi analisado utilizando dois detectores em linha, o UV e o FLD. O DEET e a permetrina foram analisados no detector UV/DAD.

A DLLME foi realizada para os 3 compostos nas condições otimizadas conforme parte experimental. Os cromatogramas obtidos após a DLLME, com as respectivas

concentrações dos padrões adicionados antes da pré-concentração são mostrados na Figura 12. Estes experimentos foram exploratórios para avaliar o método e a DLLME.

Figura 12. Separação da mistura de 17 α -etinilestradiol, DEET e permetrina



Legenda: Cromatograma da separação da mistura de 3 padrões em DLLME-HPLC-UV-FLD. Condições de análise: Coluna *Hypersil BDS* - C₁₈ (250 mm x 4.6 mmid, 5 μ m). Fase móvel: Gradiente ACN/H₂O 50:50 (v/v) até 15 minutos, seguido de ACN/H₂O 95:5 (v/v) até 30 minutos. Vazão: 1 mL/min. T 25°C. Volume de injeção: 20 μ L. a) Detector UV a 220 nm; b) FLD (λ_{ex} = 280 nm e λ_{em} = 310 nm). Picos: 1 - 17 α -etinilestradiol (1,12 mg L⁻¹), 2 - DEET (6,62 mg L⁻¹); 3- permetrina (cis) (1,22 mg L⁻¹); 4 - permetrina (trans) (1,22 mg L⁻¹).

O método analítico mostrou-se satisfatório separando os 3 compostos juntamente aos isômeros da permetrina em menos de 20 minutos. A partir da equação 1 e dos cromatogramas dos experimentos exploratórios foi possível obter a recuperação (Tabela 1). As concentrações de cada analito correspondem ao da legenda figura 12. Os resultados não foram satisfatórios, sendo necessário à otimização do método de pré-concentração off-line.

Tabela 1. Valores de recuperação obtidos a partir da área dos picos após a DLLME.

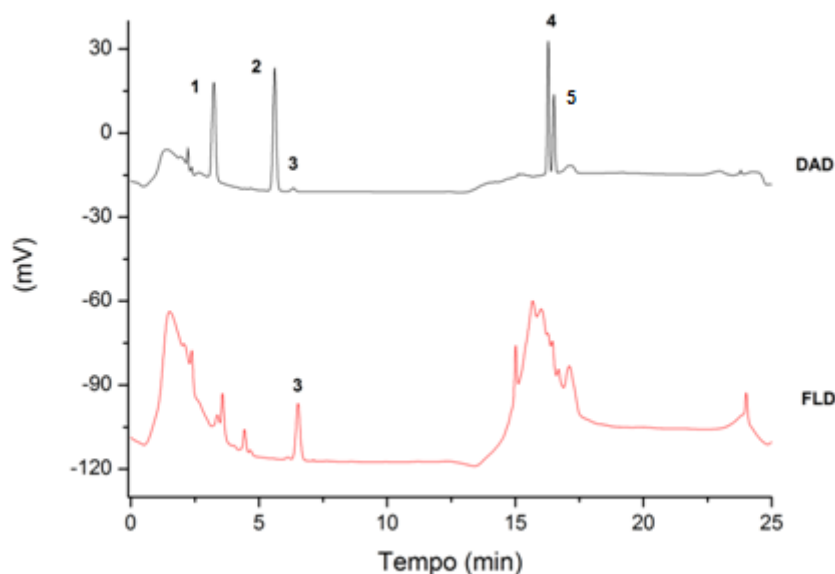
	DEET	17 α -Etinilestradiol	Permetrina (cis)	Permetrina (trans)
Recuperação (%)	4,74	19,7	21,9	29,0

4.1.2 Determinação simultânea da permetrina, DEET, 17 α -etinilestradiol e cafeína, utilizando HPLC-UV-FLD

A cafeína foi adicionada na mistura, pois apresenta grande relevância para avaliar a ação antrópica, conforme descrito na introdução. Para a separação das quatro classes de compostos foram utilizadas as condições otimizadas (figura 12), sendo necessário alterar a fase móvel. O gradiente foi otimizado para: ACN/H₂O 45:55 (v/v) até 8 min, seguido de um gradiente com ACN/H₂O na proporção 95:5 (v/v) até 18 min. Os quatro compostos foram separados em menos de 20 min, incluindo a separação dos isômeros da permetrina.

Na figura 13 é apresentado um dos cromatogramas obtidos através da análise da solução com concentração de 5 mg L⁻¹.

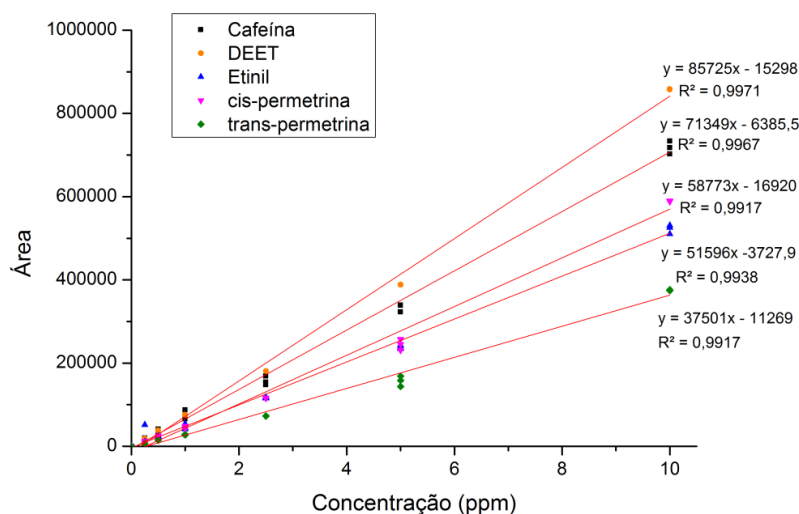
Figura 13. Separação da mistura de 17 α -etinilestradiol, DEET, permetrina e cafeína.



Legenda: Cromatograma da separação da mistura dos 4 padrões (5 mgL⁻¹ cada) em DLLME-HPLC-UV-FLD. Condições de análise: ver Figura 12. Fase móvel: Gradiente ACN/H₂O 45:55 (v/v) até 15 minutos, seguido de um gradiente com ACN/H₂O na proporção 95:5 (v/v) até 8 minutos. Picos: 1 - cafeína, 2- DEET, 3- 17 α -etinilestradiol, 4 – cis-permetrina e 5- trans-permetrina.

Para avaliar as figuras de mérito, foram preparadas seis soluções dos mix dos padrões contendo as seguintes concentrações dos analitos: 10, 5, 2,5 e 1 mg L⁻¹; 500 e 250 ng L⁻¹. As amostras foram feitas em triplicata e foi calculada a linearidade, limite de detecção e limite de quantificação. A linearidade foi avaliada através das curvas de calibração de cada um dos analitos estudados, segundo ANVISA (RDC N° 166). As soluções-padrão foram preparadas em triplicatas e as curvas apresentaram o coeficiente de determinação acima de 0,99.

Figura 14. Curva de calibração mostrando a linearidade do método instrumental no intervalo de 0,25 a 10 mg L⁻¹.



Os limites de detecção e quantificação foram calculados para cada composto, utilizando as equações 2 e 3. Os resultados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Figuras de mérito instrumental para os padrões de Cafeína, DEET, isômeros da permetrina (UV/DAD) e 17 α -etinilestradiol (FLD).

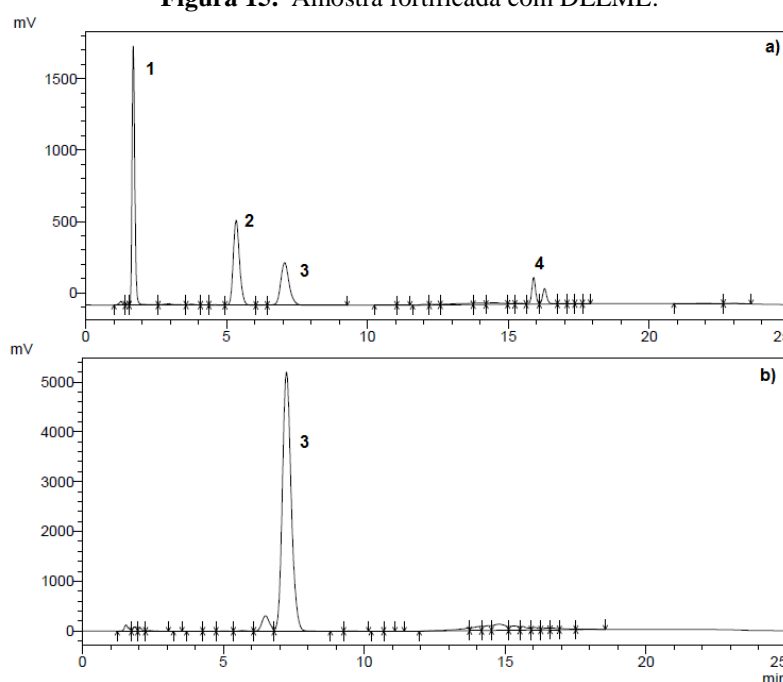
Analito	Equação linear	r ²	LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)
Cafeína	y= 71349x - 6385,5	0,9967	0,14	0,42
DEET	y= 85725x - 15298	0,9971	0,02	0,05
17 α -etinilestradiol	y= 51596x - 3727,9	0,9938	0,16	0,49
Permetrina (cis)	y= 58773x - 16920	0,9917	0,08	0,24
Permetrina (trans)	y= 37501x-11269	0,9917	0,11	0,32

Segundo a ANVISA, o limite máximo de resíduo (LMR) para a permetrina é de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ (BRASIL, 2017). Como pode ser observado na tabela 2, o LD para a permetrina ficou acima desse valor. O LD encontrado foi devido à baixa absorção do composto no UV e também pela perda da permetrina por adsorção no plástico e tubo de conexão no processo da DLLME (ARAUJO, 2004; MAUND *et al.*, 2002; SILVA, 2015). Para os outros compostos o LD também ficou acima dos valores encontrados em outros trabalhos, que estão na faixa de ng L^{-1} (HE; LEE, 1997; MPUPA *et al.* 2018; DALLA VILLA; DORES; SILVA, 2017; TORRES *et al.*, 2015; MONTAGNER; JARDIM, 2011).

A permetrina sendo apolar e tendo baixa solubilidade em água fez necessário uma otimização, adicionando ACN na parte da secagem do processo da DLLME para melhora da

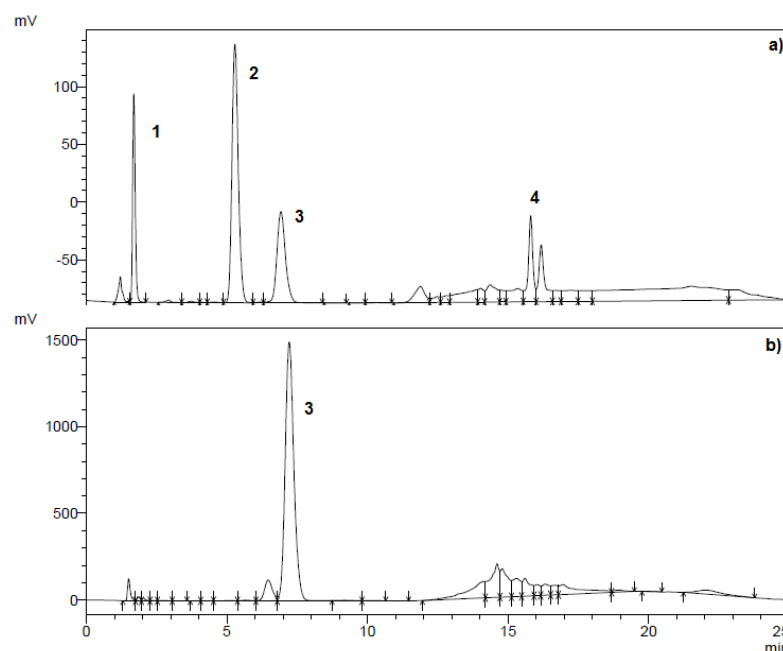
interação do analito e resolver o problema de adsorção. A quantidade de ACN foi otimizada cuidadosamente para que não diminuísse a retenção dos outros compostos (ARAÚJO, 2004; MAUND *et al.*, 2002; Silva, 2015). Ao invés de utilizar secagem à vácuo, a amostra foi deixada para secar naturalmente sobre a bancada. Após seis horas, a amostra foi ressuspensa em uma mistura de ACN/H₂O na proporção de 50:50 (nos testes anteriores ela era ressuspensa somente em água). Estes dois ajustes foram feitos com intuito de otimizar e resolver o problema da recuperação da permetrina. Para mostrar o efeito da pré-concentração da técnica, os cromatogramas obtidos da amostra fortificada com DLLME e com a aplicação da DLLME no mix da soluções padrões são mostrados na figura 15 e 16.

Figura 15. Amostra fortificada com DLLME.



Legenda: Cromatograma da separação da mistura dos 4 padrões em HPLC-UV-FLD. Condições: Ver Figura 12. Detector: a) UV a 220 nm; b) FLD (λ_{ex} = 280 nm e λ_{em} = 310 nm). Picos: 1- cafeína (3,8 mg L⁻¹), 2- DEET (2,5 mg L⁻¹), 3- 17 α -etinilestradiol (5,5 mg L⁻¹), 4-permetrina (3,5 mg L⁻¹).

Figura 16. Mix das soluções de cafeína (1), DEET (2), 17 α -etinilestradiol (3), permetrina (4), após a DLLME.



Legenda: Cromatograma da separação da mistura dos 4 padrões em DLLME-HPLC-UV-FLD. Condições: Ver Figura 12. Detector: a) UV a 220 nm; b) FLD (λ_{ex} = 280 nm e λ_{em} = 310 nm). Picos: 1 – cafeína (3,8 mg L⁻¹), 2- DEET (2,5 mg L⁻¹), 3- 17 α -etinilestradiol (5,5 mg L⁻¹), 4 – permetrina (3,5 mg L⁻¹).

Para efetuar a validação da DLLME, foram empregadas soluções da mistura dos padrões de cafeína, 17 α -etinilestradiol, DEET e permetrina, contendo as seguintes concentrações: 3,8, 5,5, 2,5 e 3,5 mg L⁻¹, respectivamente. Elas foram feitas em triplicata na DLLME, para que fosse possível determinar a recuperação e o fator de enriquecimento. O volume do solvente dispersor foi de 350 μ L e do solvente extrator 100 μ L.

A recuperação foi calculada para as novas condições da DLLME e foi de: cafeína (37%), DEET (36%), 17 α -etinilestradiol (32%), cis-permetrina (81%) e trans-permetrina (97%). Pela equação 4, foram obtidos o fator de enriquecimento de cada composto (Tabela 3).

Tabela 3. Fatores de enriquecimento do DEET, 17 α -etinilestradiol e dos isômeros da permetrina por DLLME.

Analito	Fator de enriquecimento (%)
Cafeína	74
DEET	73
17 α -etinilestradiol	64
Permetrina (cis)	163
Permetrina (trans)	194

Estes resultados de alto fator de enriquecimento se devem ao volume do solvente extrator ter sido suficiente para extrair os analitos no menor volume possível. O volume do solvente dispersor também está relacionado à eficiência da extração, pois afeta formação de microgotas de água/solvente dispersor/solvente extrator (CALDAS *et al.*, 2011).

Analizando a tabela 4 e os resultados obtidos de recuperação e fator de enriquecimento observou-se que os mesmos estão diretamente relacionados à propriedade Log P. O composto com maior valor de Log P é a permetrina que também obteve maior recuperação e fator de enriquecimento. Isto mostra que a DLLME/HPLC favoreceu a permetrina em relação aos outros compostos. Devido às condições favoráveis como mistura de solvente orgânicos e resuspensão em ACN na DLLME, e a fase móvel no HPLC contendo maior quantidade de solvente orgânico (ACN) favoreceram a permetrina devido a suas propriedades (polaridade e Log P).

Tabela 4. Propriedades físico químicas dos analitos.

Analitos	pKa	Log P	Log D	Limite máximo de resíduo ($\mu\text{g L}^{-1}$) (MS2914/2011)
Cafeína	0,6 a 14	0,01	- 0,08	---
DEET	---	1,95	2,5	---
17α-Ethinilestradiol	10,4	3,67	3,98	---
Permetrina	---	6,1	6,74	20

Fonte: HANSCH *et al.*, 1990; WILSON; BEALE; BLOCK, 2011; SONG ; BHADRA, 2017; BATHEJA *et al.*, 2009; MONTAGNER; JARDIM, 2011; SCHLEICHER, 2013; CARVALHO, 2010.

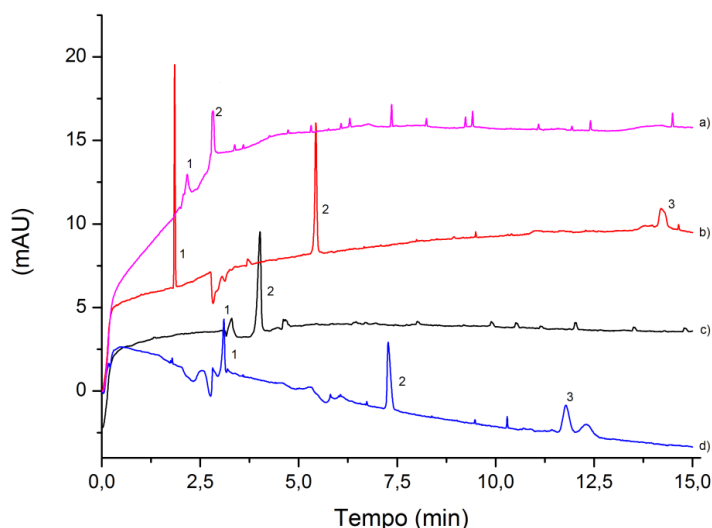
4.2 Cromatografia eletrocínética Micelar (MEKC)

O modo MEKC pode ser empregado para a análise de compostos neutros e iônicos. (PALMER ; LANDERS, 1999; SHI *et al.*, 2017). Os compostos investigados, apesar de pertencerem a 4 classes diferentes, inseticida (DEET), inseticida (piretróide) (permetrina), hormônio (17 etinilestradiol), e metilxantina (cafeína), se comportam como compostos neutros na faixa de pH útil para separação em CE, que vai de pH 2 a 11 (TAVARES, 1996). Foram testadas então diversas condições de separação utilizando o modo MEKC a fim de se obter uma separação mais rápida e eficiente dos analitos em estudo. Como em MEKC a seletividade é obtida pela interação diferenciada dos compostos neutros com o interior hidrofóbico da micela, escolheu-se trabalhar com pH básico, onde o fluxo eletroosmótico é maior e a separação é mais rápida. A composição do eletrólito foi otimizada em função da composição da amostra a ser investigada, levando em conta as 4 classe de compostos, sendo escolhido o tampão de tetraborato de sódio e SDS. Foram otimizadas as concentrações de tetraborato de sódio e dodecil sulfato de sódio (SDS) no tampão de corrida, assim como a adição de

acetonitrila como aditivo. Parâmetros instrumentais como temperatura, voltagem e comprimento de onda de detecção também foram otimizados.

O detector de UV foi ajustado em 220 nm e em 280 nm com o objetivo de verificar o comprimento de onda mais adequado para a detecção. Estes dois comprimentos de onda foram escolhidos pela análise do comprimento de onda máximo de cada composto no espectro de absorção de UV. Observou-se que para concentrações muito altas de SDS (70 mmol L^{-1}) ou de tetraborato de sódio (60 mmol L^{-1}), houve co-eluição dos analitos e para concentrações menores de SDS (20 mmol L^{-1}), não ocorreu reprodução dos resultados. A ACN pode ser adicionada ao tampão de corrida a fim de modificar a viscosidade do mesmo, extensão dos intervalos de tempos de migração e melhorar a separação (TAVARES, 1997). Porém, quando se adicionou 10 % de ACN ao tampão de corrida, também se observou uma co-eluição dos analitos. A figura 17 mostra as condições estudadas no desenvolvimento do método.

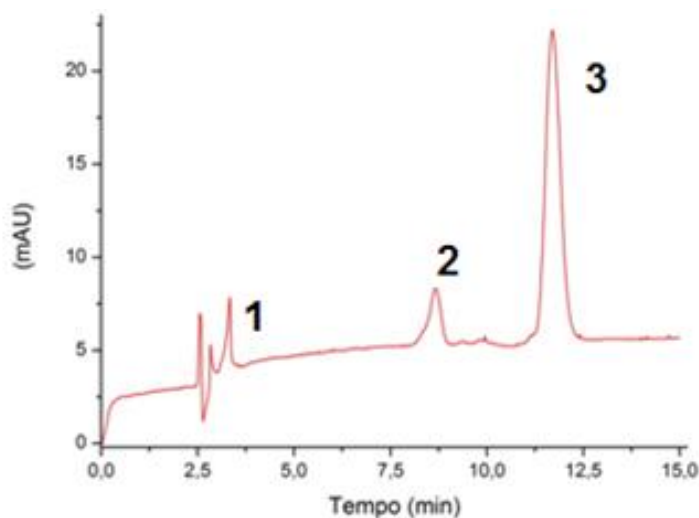
Figura 17. Eletroferograma da mistura da solução padrão dos compostos a 10 ppm em diferentes tampões.



Condições: capilar de sílica fundida de 40,2 cm de comprimento total e 30 cm de comprimento efetivo, injeção hidrodinâmica 0,5 psi por 5 s; temperatura 25°C , 15 kV e detecção em 220 nm. Picos caféina (1), DEET (2), permetrina (3) e 17α -etinilestradiol (3). Tampão: a) 50 mmol L^{-1} Borato/ 50 mmol L^{-1} SDS; b) 30 mmol L^{-1} Borato/ 100 mmol L^{-1} SDS; c) 60 mmol L^{-1} Borato/ 30 mmol L^{-1} SDS e d) 30 mmol L^{-1} Borato/ 20 mmol L^{-1} SDS; pH=9,2.

Comparando os eletroferogramas b) e d) da figura 17 é possível perceber que o aumento ou diminuição da concentração de SDS afeta a separação dos analitos. O sistema micelar que se mostrou mais eficiente para a análise foi constituído de 30 mmol L^{-1} de tetraborato de sódio e 40 mmol L^{-1} de SDS. O eletroferograma mostrando a separação otimizada é mostrado na figura 18.

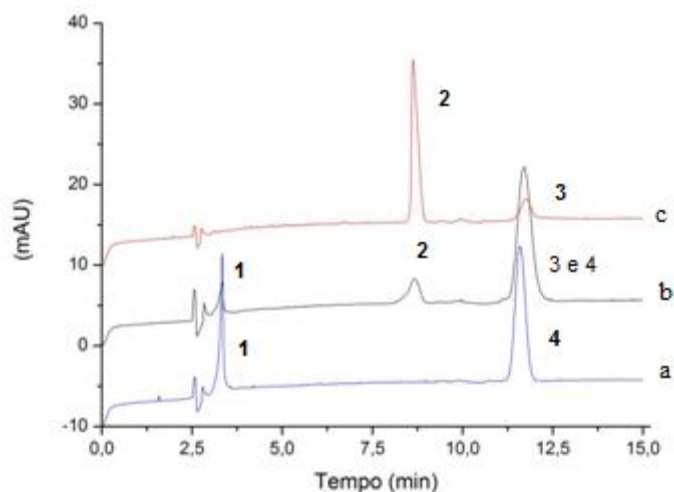
Figura 18. Eletroferograma da mistura da solução padrão dos compostos a 10 mg L^{-1} .



Condições: vide Figura 17. Tampão 30 mmol L^{-1} tetraborato de sódio e 40 mmol L^{-1} SDS (pH 9,2). Picos cafeína (1), DEET (2), permetrina (3) e 17α -etinilestradiol (3).

A cafeína possui um átomo de nitrogênio protonável, mas devido ao seu pK_a estar fora da faixa útil de pH para as separações eletrofóreticas, sua determinação simultânea é feita por MEKC (MORAES *et al.*, 2003). A cafeína migrou num tempo de 3,5 minutos, saindo quase junto do fluxo. O DEET foi bem separados dos demais compostos, com um tempo de migração de 8 minutos. Foi visualizado mais um único pico a 12 minutos. Suspeitou-se que ocorreu uma co-eluição do 17α -etinilestradiol e da permetrina. Para verificar esta co-eluição, foram injetadas a mistura dos compostos de dois em dois: primeiro cafeína com 17α -etinilestradiol, e depois DEET com permetrina e a seguir a mistura com os quatro compostos. A figura 19 comprova a co-eluição do 17α -etinilestradiol e permetrina.

Figura 19. Verificação da co-eluição da permetrina e do 17α -etinilestradiol.



Condições: vide Figura 17. Picos: cafeína (1), DEET (2), permetrina (3) e 17 α -etinilestradiol (4), detecção em 220 nm. Concentrações e analitos: a) Cafeína (100 mg L⁻¹) e 17 α -etinilestradiol (100 mg L⁻¹); b) Mix (10 mg L⁻¹); c) DEET e permetrina (100 mg L⁻¹). Vale o mesmo pras outras figuras 20 e 21

Foram realizados alguns testes para efetivar a separação dos dois compostos, porem, sem sucesso. Como o objetivo do trabalho era o estudo das estratégias de pré-concentração, optamos por realizar as estratégias de *stacking* e *sweeping* sem o 17 α -etinilestradiol na mistura.

4.2.1 Estratégias de pré-concentração online

Após a otimização da condição de separação por MEKC, foram testadas as estratégias de *stacking*, a fim de se observar se haveria a pré-concentração dos compostos. No *stacking* em modo normal (SMN), a amostra foi injetada por pressão durante 10, 15 e 20 segundos. O tempo de injeção de 20 segundos apresentou um aumento maior da área dos picos dos compostos em comparação a área dos picos sem o uso do *stacking*. Porém, a dispersão foi maior, o alargamento dos picos junto com perda de resolução. Isto provavelmente é devido à solução de baixa condutividade ou a zona da amostra introduzida no capilar, portanto dependendo da fase pseudo-estacionária (QUIRINO; TERABE, 1997; PALMER; LANDERS, 2000; SHI *et al.*, 2017).

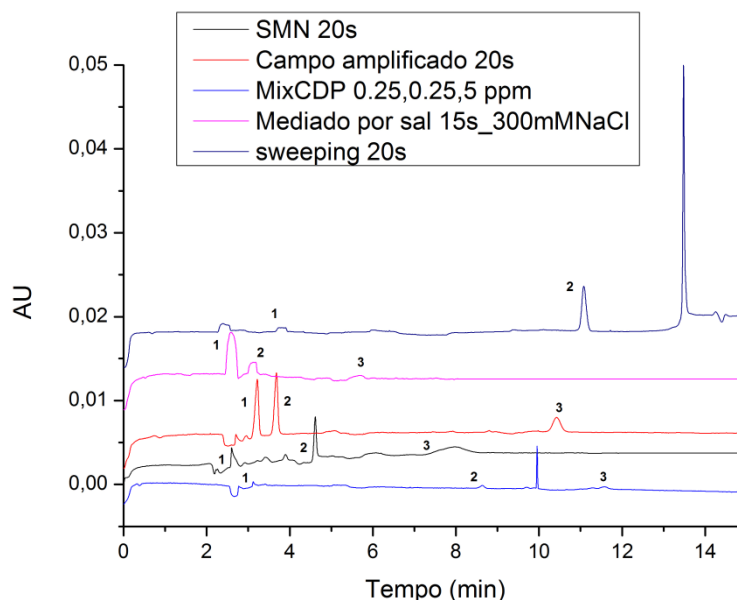
No modo de *stacking* em campo amplificado, primeiro foi injetada uma banda de água no modo hidrodinâmico (0,5 psi por 10 s) e a seguir foi injetada a amostra por injeção eletrocínica (5 kV durante 20 s). A injeção da banda de água garante um campo elétrico elevado no ponto de injeção. Os analitos que estão dissolvidos nas micelas são acelerados quando entram na zona de água e após ultrapassarem a zona de água e o eletrólito de corrida, o campo elétrico é menor e, portanto desacelera causando a pré-concentração em uma banda fina (MORAES; TAVARES; PEREIRA, 2010).

Para o *stacking* mediado por sal foi adicionado uma solução de 300 mmol L⁻¹ de um sal (NaCl) na amostra, o que causa um aumento da condutividade da banda da mesma (PALMER; LANDERS, 1999). Foram testadas algumas concentrações de sais (100 mmol L⁻¹ a 500 mmol L⁻¹) na amostra, sendo a que teve melhor resultado foi a de 300 mmol L⁻¹. Ao aplicar a tensão, ocorre a geração de um baixo campo elétrico na zona da amostra (que possui maior condutividade do que o eletrólito de corrida) e um alto campo elétrico na banda do eletrólito de corrida. As micelas (com carga negativa) seguem rapidamente em direção ao polo positivo e são desaceleradas na fronteira entre a amostra e o eletrólito, ocorrendo o

stacking das micelas (MORAES; TAVARES; PEREIRA, 2010). Os três analitos foram separados em menos de 12 min.

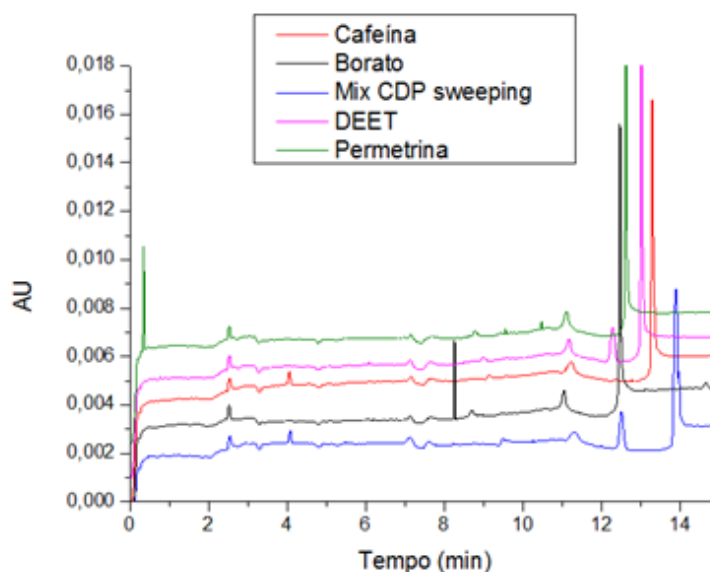
A Figura 20 apresenta uma comparação da amostra injetada no *stacking* em modo normal, em campo amplificado, mediado por sal, *sweeping* e injeção da amostra sem *stacking*.

Figura 20. Estratégias de pré-concentração on-line aplicadas aos padrões dos compostos.



Condições de análise: vide Figura 17. Picos: caféina (1) ($0,25 \text{ mg L}^{-1}$), DEET (2) ($0,25 \text{ mg L}^{-1}$), permetrina (3) (5 mg L^{-1}), detecção em 220 nm.

Para o *sweeping* foram testadas diversas condições experimentais a fim de se obter a melhor separação e quantificação dos analitos, como a adição de solventes orgânicos (ACN e MeOH) na amostra (CHENG; TSAI, 200; WEN *et. al.*,2012), adição de sal na amostra (QUIRINO; TERABE; BOCEK, 2000), variação na concentração de borato (QUIRINO; TERABE, 2001), tempo de injeção (QUIRINO; KIM; TERABE, 2002; MORAES; TAVARES; PEREIRA, 2010; WEN *et. al.*,2012; WEI *et. al.*,2006) e inversão da polaridade (WEN *et. al.*,2012; WEI *et. al.*,2006). Porém, nas condições testadas os resultados não foram satisfatórios, persistindo o problema da co-eluição da permetrina com o eletrólito (borato), o que fez com que não fosse possível quantificar a permetrina. Para o DEET e a caféina foi possível obter uma pré-concentração como pode ser observado na figura 21. A melhor condição experimental, obtida na presença de fluxo eletrosmótico, foi à injeção da amostra (preparada em uma solução de 50 mmol L^{-1} de borato, sem micelas) por um longo tempo (acima de 40 s) em modo hidrodinâmico.

Figura 21. Tentativa de *sweeping* da amostra preparada em borato.

Condições de análise: vide Figura 17. Mistura dos padrões e das soluções padrões preparadas em borato.

A Tabela 5 apresenta a comparação das áreas dos picos dos compostos antes e após as estratégias de *stacking* e a Tabela 6 mostra os aumentos das áreas dos picos das estratégias de pré-concentração on-line em relação ao pico sem *stacking* para cada composto. O aumento foi calculado a partir da relação da área da técnica de pré-concentração avaliada com a área do sem *stacking*.

Tabela 5. Comparação das áreas dos picos dos padrões com e sem a aplicação da estratégia de pré-concentração on-line.

	Cafeína	DEET	Permetrina
Sem <i>stacking</i>	6256	2565	2492
SMN	9617	21663	28066
SMCA	36649	41148	23277
SMSAL	64590	18965	4947
<i>Sweeping</i>	9166	35768	----

Tabela 6. Comparação dos aumentos das áreas dos eletroferogramas da figura 20.

	Cafeína	DEET	Permetrina
SMN	1,5	8	11
SMCA	6	16	9
SMSAL	10	7	2
<i>Sweeping</i>	1,5	14	---

Analisando a figura 20 e as tabelas 5 e 6, observa-se que na estratégia SMN houve um aumento das áreas dos picos, mas, devido o aumento da dispersão, ocorreu o alargamento dos picos junto com a perda de resolução (MORAES; TAVARES; PEREIRA, 2010). O maior aumento ocorreu para a permetrina. No caso da SMCA ocorreu um aumento das áreas dos picos e a diminuição do tempo de retenção dos compostos. A injeção da banda de água e o fato da amostra estar dissolvida em micelas, fez com que a pré-concentração ocorresse em bandas finas. Nesta estratégia, o maior aumento foi para o DEET. Na estratégia SMSAL foi observado um aumento das áreas dos picos do DEET e cafeína, mas para a permetrina este aumento não foi significativo. O tempo de retenção foi menor também, mas os picos tiveram uma perda de resolução devido à dispersão e a fase pseudo-estacionária (PALMER; LANDERS, 2000). A cafeína apresentou o maior aumento em SMSAL. No sweeping houve co-eluição da permetrina e borato. Mas ocorreu um aumento significativo para o DEET e um pouco para a cafeína.

A eletroforese capilar (CE) é uma alternativa interessante em relação ao HPLC devido ao baixo ou nenhum consumo de solvente orgânico e gerando pouco resíduo, sendo considerada uma “green analytical technique”. Enquanto para o HPLC é necessário a utilização de grandes volumes de solventes (mL) a CE utiliza pequenos volumes (μL), gerando pouco ou quase nenhum resíduo orgânico. Os custos de análise da HPLC são também maiores que o da eletroforese capilar (BIZZOTTO *et al.*, 2013). Em relação ao tempo de análise dos compostos, a CE é mais rápida que o HPLC. Mas a CE é menos sensível que o HPLC, o que faz necessário a utilização de estratégias de pré-concentração, especialmente na área ambiental onde os compostos são encontrados em nível de traços. A combinação de eletroforese capilar e estratégias de pré-concentração on-line em sua maioria reduziram o tempo análise, enquanto a combinação da DLLME e HPLC não reduziu o tempo de análise. As estratégias de *stacking* não proporcionaram uma pré-concentração de todos os analitos, empregando uma única estratégia de *stacking*.

Como perspectivas futuras, poderão ser testadas novas condições de solventes extratores e dispersores para aumentar a recuperação em DLLME. Além disso, poderão ser empregadas a DLLME e o *stacking* juntos, antes da separação em MEKC, afim de melhorar o limite de detecção e quantificação. Uma vez otimizados, ambos os métodos poderão ser aplicados em amostras de água de efluentes a fim de se avaliar o efeito de matriz.

5. Conclusão

Os métodos desenvolvidos para determinação do DEET, permetrina, 17 α -etinilestradiol e cafeína foram simples e de fácil execução. O método em HPLC provou ser eficiente em separar os 4 compostos e ainda os dois isômeros da permetrina em menos de 20 minutos. A recuperação após a DLLME, foi de aproximadamente 37% para a cafeína, 36% para o DEET, 32 % para o 17 α -etinilestradiol, 81% para o cis-permetrina e 97% para a trans-permetrina.

O método em eletroforese capilar foi eficiente, dentro das condições experimentais utilizadas neste experimento, em separar os três compostos em estudo (cafeína, DEET e permetrina) em menos de 15 minutos. As estratégias de pré-concentração on-line (*stacking*) avaliadas foram satisfatórias, sendo simples de serem realizadas e proporcionaram aumentos da ordem de 5-7 vezes da área do pico para os compostos em comparação com a área dos picos sem *stacking*, porém, nenhuma delas proporcionou aumentos expressivos para os 3 compostos juntos.

Estes resultados mostram que a aplicação das estratégias de *stacking* são dependentes da classe de compostos que se está analisando, justamente pelas particularidades de cada estratégia. Em amostras ambientais, especialmente em águas de efluentes, encontramos varias classes de compostos juntas e em baixa concentração, o que representa um desafio analítico grande em termos de separação e pré-concentração, a fim de se atingirem os limites adequados, previstos nas normativas e regulamentações. A eletroforese capilar poderá ter um impacto real na área ambiental nas próximas décadas, uma vez que sejam desenvolvidos métodos de separação e estratégias de pré-concentração que possam ser aplicadas para análise de várias classes de contaminantes simultaneamente.

Referências

- ALTRIA, Kevin D., ed. **Capillary electrophoresis guidebook: principles, operation, and applications**. Vol. 52. Springer Science & Business Media, 1996.
- ALVES, Andreia et al. **Ultrasound assisted extraction combined with dispersive liquid–liquid microextraction (US-DLLME)—a fast new approach to measure phthalate metabolites in nails**. *Analytical and bioanalytical chemistry*, v. 408, n. 22, p. 6169-6180, 2016.
- ANDRADE, Carlos Fernando S.; DEPTO DE ZOOLOGIA, I. B. **Repelentes de Mosquitos–Base Técnica para Avaliação**. UNICAMP, Inst. de Biologia, Dep. de Zoologia. Site Ecologia Aplicada, 9pp, 2008. Disponível em: http://www.ib.unicamp.br/profs/eco_aplicada/. Acesso em: 24/11/2018.
- ANVISA, BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); *Resolução RE nº 899*, de 29/05/2003.
- ANVISA, BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada-RDC Nº 166. 2017.
- ANVISA, BRASIL. Portaria de consolidação nº 5, de 28 de setembro de 2017. Consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde. **Diário Oficial da União**, 2017.
- ARAUJO, Mara Bertrand Campos de. **Estudo de um método multiclasse/multirresíduo para a determinação de pesticidas em amostras aquosas**. 2004. 173 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.
- BATHEJA, Priya *et al.* **Effects of growth conditions on the barrier properties of a human skin equivalent**. *Pharmaceutical research*, v. 26, n. 7, p. 1689-1700, 2009.
- BIZZOTTO, Carolina Schaper et al. **Comparison of capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography methods for caffeine determination in decaffeinated coffee**. *Food Science and Technology*, v. 33, n. 1, p. 186-191, 2013.
- BONATO, Pierina Sueli; JABOR, Valquíria Aparecida Polisel; GAITANI, Cristiane Masetto de. **Análise enantiosseletiva de fármacos: contribuições da cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar**. *Quim. Nova*, v. 28, n. 4, p. 683-691, 2005.
- BYKOVA, Liliya; HOLLAND, Lisa A. **Stacking enhanced determination of steroids by CE**. *Electrophoresis*, v. 29, n. 18, p. 3794-3800, 2008.
- CALDAS, Sergiane Souza *et al.* **Principais técnicas de preparo de amostras para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas**. *Química Nova*, v.34, n.9, p. 1604-1617, 2011.

CANELA, M. C. *et al.* **Caféina em águas de abastecimento público no Brasil.** Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias Analíticas Avançadas–INCTAA, Editora Cubo, São Carlos, 100p, 2014.

CARVALHO, Adriana Pimentel de Almeida. **Otimização e validação de método para análise simultânea de dicofol, permetrina, dieldrin, endosulfan e diclorvos em ração animal, fígado e cérebro de ratos.** 2010. 134 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, 2010.

CARLSON, D. A. 2000. **Repellents.** Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, (Ed).

CHEN, Szu-Ying; CHEN, Wen-Chi; CHANG, Sarah Y. **Cyclodextrin-assisted dispersive liquid–liquid microextraction for the preconcentration of carbamazepine and clobazam with subsequent sweeping micellar electrokinetic chromatography.** Journal of separation science, v. 41, n. 8, p. 1871-1879, 2018.

CHENG, Cheanyeh; TSAI, Hsiang-Rong. **Application of simple on-line sweeping sample concentration technique coupled micellar electrokinetic chromatography for simultaneous analysis of estrogen and androgen epimer.** Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, v. 56, n. 4, p. 728-735, 2011.

COLLIER, Avril *et al.* **Microchip micellar electrokinetic chromatography coupled with electrochemical detection for analysis of synthetic oestrogen mimicking compounds.** Analytica chimica acta, v. 550, n. 1-2, p. 107-115, 2005.

CONAMA, BRASIL. 2011. **Resolução CONAMA nº 430, de 13 de maio de 2011.** Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA.

Costanzo, S. D., *et al.* **"Is there a risk associated with the insect repellent DEET (N,N-diethyl-m-toluamide) commonly found in aquatic environments?."** *Science of the Total Environment* 384.1-3 (2007): 214-220

COSTANZO, S. D. *et al.* **Is there a risk associated with the insect repellent DEET (N, N-diethyl-m-toluamide) commonly found in aquatic environments?.** *Science of the Total Environment*, v. 384, n. 1-3, p. 214-220, 2007.

CUNHA, Danieli Lima da *et al.* **Regulation of the synthetic estrogen 17 α -ethinylestradiol in water bodies in Europe, the United States, and Brazil.** *Cadernos de Saúde Pública*, v. 32, n. 3, 2016.

DABEK-ZLOTORZYNSKA, Ewa; CELO, Valbona. **Recent advances in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography of pollutants.** *Electrophoresis*, v. 27, n. 1, p. 304-322, 2006.

DALLA VILLA, Ricardo; DORES, Eliana; SILVA, Adriana. **Método Analítico Multiclasses Para Determinação de Agrotóxicos Em Água Utilizando DLLME e CG-MS.** *Revista Virtual de Química*, v. 9, n. 2, 2017.

DE MARIA, Carlos AB; MOREIRA, Ricardo FA. **Cafeína: revisão sobre métodos de análise.** Química Nova, v. 30, n. 1, p. 99-105, 2007.

D'ORAZIO, Giovanni et al. **Estrogenic compounds determination in water samples by dispersive liquid–liquid microextraction and micellar electrokinetic chromatography coupled to mass spectrometry.** Journal of Chromatography A, v. 1344, p. 109-121, 2014.

EPA. *U. S. Environmental Protection Agency* – Disponível em: <https://www.epa.gov/aboutepa/about-national-exposure-research-laboratory-nerl>, Acesso em 22 de Abril de 2017.

EPA. *United States Environmental Protection Agency* – Disponível em: <http://extoxnet.orst.edu/faqs/pesticide/endocrine.htm>. Acesso em: 22 de Abril de 2017.

EPA. U.S. Environmental Protection Agency. **Reregistration eligibility decision (RED) for DEET**, EPA 738-R-98-010, Washington, DC.; 1998.

FERNANDES, Andreia N. *et al.* **Remoção dos hormônios 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol de soluções aquosas empregando turfa decomposta como material adsorvente.** Química Nova, São Paulo, v. 34, n. 9, p. 1526-1533, 2011.

FRAZIER, Richard A.; AMES, Jennifer M.; NURSTEN, Harry E. **Capillary electrophoresis for food analysis: Method development.** Royal Society of Chemistry, 2007.

HANSCH, Corwin; SAMMES, Peter George; TAYLOR, John Bodenhan. **Comprehensive medicinal chemistry: the rational design, mechanistic study & therapeutic applications of chemical compounds.** Vol. 6 Pergamon Pr, 1991.

HE, Yan; LEE, Hian K. **Combination of solid-phase extraction and field-amplified concentration for trace analysis of organonitrogen pesticides by micellar electrokinetic chromatography.** Electrophoresis, v. 18, n. 11, p. 2036-2041, 1997.

JARDIM, W. Água de 20 capitais tem ‘contaminantes emergentes’. **Jornal da Unicamp**, v. 576, 2013. Disponível em: <https://www.unicamp.br/unicamp/ju/576/agua-de-20-capitais-tem-contaminantes-emergentes>. Acessado em: 28/11/2018.

KIM, Sang D. *et al.* **Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters.** Water research, v. 41, n. 5, p. 1013-1021, 2007.

KOHLER, Isabelle et al. **Dispersive liquid–liquid microextraction combined with capillary electrophoresis and time-of-flight mass spectrometry for urine analysis.** Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, v. 73, p. 82-89, 2013.

LIU, Yaling; JIA, Li. **Analysis of estrogens in water by magnetic octadecylsilane particles extraction and sweeping micellar electrokinetic chromatography.** Microchemical Journal, v. 89, n. 1, p. 72-76, 2008.

MAHUGO-SANTANA, Cristina *et al.* **Application of new approaches to liquid-phase microextraction for the determination of emerging pollutants.** TrAC Trends in Analytical Chemistry, v. 30, n. 5, p. 731-748, 2011

MA, Ruixue *et al.* **Characterization of pharmaceutically active compounds in Dongting Lake, China: Occurrence, chiral profiling and environmental risk.** *Science of The Total Environment*, v. 557, p. 268-275, 2016.

MAUND, Steve J. *et al.* **Partitioning, bioavailability, and toxicity of the pyrethroid insecticide cypermethrin in sediments.** *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, v. 21, n. 1, p. 9-15, 2002.

MENG, Liang *et al.* **Application of dispersive liquid-liquid microextraction and CE with UV detection for the chiral separation and determination of the multiple illicit drugs on forensic samples.** *Forensic science international*, v. 209, n. 1-3, p. 42-47, 2011.

MONTAGNER, Cassiana C.; JARDIM, Wilson F. **Spatial and seasonal variations of pharmaceuticals and endocrine disruptors in the Atibaia River, São Paulo State (Brazil).** *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 22, n. 8, p. 1452-1462, 2011.

MORAES, Maria de Lourdes Leite de *et al.* **Separação e análise de metilxantinas em extratos de guaraná e erva mate por eletroforese capilar.** *Analytica*, v. 5, p. 44-50, 2003.

MORAES, Maria de Lourdes Leite de *et al.* **Estratégias de pré-concentração em eletroforese capilar (CE): parte 1. Manipulação da velocidade eletroforética do analito.** *Química Nova*, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 1041-1046, 2009.

MORAES, Maria de Lourdes Leite de; TAVARES, Marina Franco Maggi; PEREIRA, Elisabete Alves. **Estratégias de pré-concentração em eletroforese capilar: parte 2. Manipulação da velocidade da fase dispersa/secundária.** *Química Nova*, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 466-470, 2010.

MOREIRA, Davi S. *et al.* **Occurrence of endocrine disrupting compounds in water sources of Belo Horizonte Metropolitan Area, Brazil.** *Environmental Technology*, v. 30, n. 10, p. 1041-1049, 2009.

MOREIRA, Bruna Juliana; YOKOYA, Jennifer Michiko Chauca; GAITANI, CM de. **Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME): fundamentos, inovações e aplicações biológicas.** *Scientia Chromatographica*, v. 6, n. 3, p. 186-204, 2014.

MPUPA, Anele; MASHILE, Geaneth P.; NOMNGONGO, Philiswa N. **Ultrasound-assisted dispersive solid phase nanoextraction of selected personal care products in wastewater followed by their determination using high performance liquid chromatography-diode array detector.** *Journal of hazardous materials*, v. 370, p. 33-41, 2019.

PALMER, James; MUNRO, Nicole J.; LANDERS, James P. **A universal concept for stacking neutral analytes in micellar capillary electrophoresis.** *Analytical chemistry*, v. 71, n. 9, p. 1679-1687, 1999.

PALMER, James; LANDERS, James P. **Stacking neutral analytes in capillary electrokinetic chromatography with high-salt sample matrixes.** *Analytical Chemistry*, v. 72, n. 8, p. 1941-1943, 2000.

PARENTE, Camila Cordeiro. **Emprego de resíduos da indústria sucroalcooleira impregnados de nanopartículas de magnetita para sorção de DEET e Permetrina.** 2016. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia da Sustentabilidade) Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, Diadema, 2016.

PAULA, Josiane P. *et al.* **Atividade repelente do óleo essencial de *Ocimum selloi* Benth.(variedade eugenol) contra o *Anopheles braziliensis* Chagas.** Acta Farmaceutica Bonaerense, v. 23, p. 376-378, 2004.

QUEIROZ, Sonia CN *et al.* **Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica.** Química Nova, São Paulo , v. 24, n. 1, p. 68-76, 2001.

QUIGLEY, Andrew; CUMMINS, Wayne; CONNOLLY, Damian. **Dispersive liquid-liquid microextraction in the analysis of milk and dairy products: a review.** Journal of Chemistry, vol. 2016, Article ID 4040165, 12 pages, 2016.

QUIRINO, Joselito P.; TERABE, Shigeru. **On-line concentration of neutral analytes for micellar electrokinetic chromatography I. Normal stacking mode.** Journal of Chromatography A, v. 781, n. 1-2, p. 119-128, 1997.

QUIRINO, Joselito P.; TERABE, Shigeru; BOCEK, Petr. **Sweeping of neutral analytes in electrokinetic chromatography with high-salt-containing matrixes.** Analytical chemistry, v. 72, n. 8, p. 1934-1940, 2000.

QUIRINO, J. P.; TERABE, S. **Sweeping of neutral analytes via complexation with borate in capillary zone electrophoresis.** Chromatographia, v. 53, n. 5-6, p. 285-289, 2001.

QUIRINO, Joselito P.; KIM, Jong-Bok; TERABE, Shigeru. **Sweeping: concentration mechanism and applications to high-sensitivity analysis in capillary electrophoresis.** Journal of Chromatography A, v. 965, n. 1-2, p. 357-373, 2002.

RIBANI, Marcelo *et al.* **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos.** Quím. Nova, São Paulo , v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004 .

ROBBINS, Philip J.; CHERNIACK, Martin G. **Review of the biodistribution and toxicity of the insect repellent N, N-diethyl-m-toluamide (DEET).** Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues, v. 18, n. 4, p. 503-525, 1986.

ŠATÍNSKÝ, Dalibor *et al.* **An on-line SPE–HPLC method for effective sample preconcentration and determination of fenoxycarb and cis, trans-permethrin in surface waters.** Talanta, v. 142, p. 124-130, 2015.

SAUVÉ, Sébastien; DESROSIERS, Mélanie. **A review of what is an emerging contaminant.** Chemistry Central Journal, v. 8, n. 1, p. 1-7, 2014

SCHLEICHER, Arthur Tavares. **Remoção de estrona, estradiol, etinilestradiol e bisfenol-A por meio de nanofiltração aplicada ao tratamento avançado de águas**

para consumo humano. 2013. xix, 107 f., il. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos)—Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

SEGATO, Milena Pinotti; SILVA, César Ricardo; JARDIM, Isabel Cristina Sales Fontes. **Eletrocromatografia capilar: contextualização, estado da arte e perspectivas.** Quím. Nova, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 431-440, 2009.

SHI, Ludi *et al.* **Determination of chlorophenols in water using dispersive liquid-liquid microextraction coupled with water-in-oil microemulsion electrokinetic chromatography in normal stacking mode.** Journal of separation science, v. 40, n. 12, p. 2662-2670, 2017.

SILVA, Angelica M. **Avaliação ecotoxicológica do agrotóxico permetrina através de ensaios de toxicidade com invertebrados aquáticos.** 162p. Dissertação (mestrado) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/USP, São Paulo, 2005.

SILVA, João Paulo Reis da *et al.* **Desenvolvimento de um sistema de análise por injeção em fluxo para pré concentração de Cd sobre resina de XAD-4 modificada com fenilfluorona e determinação por espectrometria de absorção atômica.** Química Nova, v. 39, n. 5, p. 561-566, 2016.

SILVA, Rogério F. *et al.* **Identificação e Quantificação de Contaminantes Emergentes em Estações de Tratamento de Esgoto.** Revista Virtual de Química, v. 8, n. 3, p. 702-715, 2016.

SILVA, Viviane Benevenuti. **Determinação simultânea de etinilestradiol e drospirenona em contraceptivos orais por cromatografia e fase líquida de alta eficiência e eletroforese capilar.** 2012. Dissertação (Mestrado em Produção e Controle Farmacêuticos)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

SIRÉN, Heli; SEPPÄNEN-LAAKSO, Tuulikki; OREŠIČ, Matej. **Capillary electrophoresis with UV detection and mass spectrometry in method development for profiling metabolites of steroid hormone metabolism.** Journal of Chromatography B, v. 871, n. 2, p. 375-382, 2008.

SKOOG, WEST, HOLLER, CROUCH, **Fundamentos de Química Analítica**, Tradução da 8ª Edição norte-americana. Editora Thomson, São Paulo-SP, 2006. 2.

SODRÉ, F. F. *et al.* **Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos em águas superficiais da região de Campinas (SP, Brasil).** Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology, v. 2, n. 2, p. 187-196, 2007.

SOMSEN, Govert W.; MOL, Roelof; DE JONG, Gerhardus J. **On-line coupling of electrokinetic chromatography and mass spectrometry.** Journal of Chromatography A, v. 1217, n. 25, p. 3978-3991, 2010.

SONG, Ji Yoon; BHADRA, Biswa Nath; JHUNG, Sung Hwa. **Contribution of H-bond in adsorptive removal of pharmaceutical and personal care products from water using oxidized activated carbon.** Microporous and Mesoporous Materials, v. 243, p. 221-228, 2017.

SPUDEIT, Daniel Alfonso; DOLZAN, Maressa Danielli; MICKE, Gustavo Amadeu. **Conceitos básicos em eletroforese capilar**. Scientia Chromatographica, v. 4, n. 4, p. 287-297, 2012.

SUDAKIN, Daniel L.; TREVATHAN, Wade R. **DEET: a review and update of safety and risk in the general population**. Journal of Toxicology: Clinical Toxicology, v. 41, n. 6, p. 831-839, 2003.

TAVARES, Marina FM. **Eletroforese capilar: conceitos básicos**. Química Nova, v. 19, n. 2, p. 173-181, 1996.

TAVARES, M. F. M. **Mecanismos de separação em eletroforese capilar**. Química nova, v. 20, n. 5, p. 493-511, 1997.

TORRES, Nádia Hortense *et al.* **Detection of hormones in surface and drinking water in Brazil by LC-ESI-MS/MS and ecotoxicological assessment with *Daphnia magna***. Environmental monitoring and assessment, v. 187, n. 6, p. 379, 2015.

USGS *United States Geological Survey* – Disponível em: <https://toxics.usgs.gov/investigations/cec/index.php>. Acesso em: 22 de Abril de 2017.

WEI, Jin-Chao *et al.* **Sensitive detection of organophosphorus pesticides in medicinal plants using ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction combined with sweeping micellar electrokinetic chromatography**. Journal of agricultural and food chemistry, v. 64, n. 4, p. 932-940, 2016.

WEN, Yingying *et al.* **Recent advances in enrichment techniques for trace analysis in capillary electrophoresis**. Electrophoresis, v. 33, n. 19-20, p. 2933-2952, 2012.

WILSON, Charles Owens; BEALE, John Marlowe; BLOCK, John H. **Wilson and Gisvold's textbook of organic medicinal and pharmaceutical chemistry**. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins,, 2011.

YE, Fanggui *et al.* **Determination of pyrethroid pesticide residues in vegetables by pressurized capillary electrochromatography**. Talanta, v. 69, n. 1, p. 97-102, 2006.

ZWEIG, Gunter; SHERMA, Joseph (Ed.). **Synthetic pyrethroids and other pesticides**. Academic Press, 1984.